Aus dem Institut für Medizin
der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Direktor: Prof. Dr. L. E. Feinendegen

# NICHT-INVASIVE UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSKINETIK EINES SOLIDEN EXPERIMENTALTUMORS (SARKOM-180)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Henrichs

aus Eschweiler

1979

Aus dem Institut für Medizin
der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Direktor: Prof. Dr. L. E. Feinendegen

# NICHT-INVASIVE UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSKINETIK EINES SOLIDEN EXPERIMENTALTUMORS (SARKOM-180)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Henrichs
aus Eschweiler

1979

INHALT

# I. EINLEITUNG

Untersuchungen zur Wachstums- und Zellkinetik von Experimentaltumoren haben in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung für die Tumorforschung gewonnen: sie führen zu einem weitergehenden Verständnis des Geschehens in einem ungestörten (unbehandelten) Tumor, erlauben aber vor allem auch die Verbesserung bestehender und die Entwicklung neuer Therapiemethoden (Gantzer 1969, Wagner 1973, Klein 1974, Andreeff 1974 u. 1975). Außerdem ermöglichen die aus tumorkinetischen Untersuchungen gewonnenen Kenntnisse die vergleichende Beurteilung der Wirkung verschiedener Therapien (Pittner 1973, Jentzsch 1976, Weber 1976, Gewehr 1977).

Dennoch sind heute die meisten Tumoren, die für experimentelle Untersuchungen verwendet werden, bezüglich ihrer zellkinetischen Parameter nur unvollständig bekannt (van Putten 1974) und es stehen zu wenig ausreichende Daten zur Verfügung, die beispielsweise die Optimierung von Dosierungsschemata der Strahlen- oder der Chemotherapie ermöglichen würden.
Die vorliegende Arbeit hat dementsprechend die Aufgabe, experimentell die Parameter zu ermitteln, die das Wachstum des im Labor für experimentelle Tumortherapie (Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich) verwendeten Experimentaltumors (Sarkom-180 auf NMRI-Mäusen) bestimmen. Von besonderer Bedeutung für die Anwendbarkeit der zu gewinnenden Daten in Therapie und Forschung ist es, diese ohne Störung der Beziehungen zwischen Tumor und Wirtstier zu ermitteln. Dementsprechend werden in der vorliegenden Untersuchung überwiegend nicht-invasive in-vivo Meßmethoden angewandt, die in den vergangenen Jahren am Institut für Medizin der KFA Jülich entwickelt wurden (Porschen und Feinendegen 1969 u. 1974). Bei diesen Techniken werden durch den Einbau radioaktiv markierter Vorläufer in die Zell-DNA Tumorzellen markiert und durch externe Aktivitätsmessungen die Proliferationsaktivität des unter-

# 1. EINLEITUNG

Untersuchungen zur [illegible] und Zellkinetik von [illegible] humoraler [illegible] in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung für die Tumorforschung gewonnen und führen zu einem zellbiologischen Verständnis des Tumorwachstums in vitro, [illegible] Tumor, [illegible] die Tumorbehandlung und die Entwicklung neuer Therapiemethoden (Becker 1978, Wagner 1977, Klein 1979, [illegible] 1978 u. 1979, [illegible] über die aus [illegible] Untersuchungen gewonnenen Daten ohne die [illegible] Bedeutung [illegible] Tumoren [illegible] 1978, [illegible] 1976, [illegible] 1979).

Dennoch sind heute die meisten Tumoren, die für experimentelle Untersuchungen verwendet werden, bezüglich ihrer zellkinetischen Parameter nur unzulänglich bekannt (vgl. Patten 1978) und es stehen zu wenig ausreichende Daten zur Verfügung, die beispielsweise die Optimierung von Bestrahlungsschemata bei Strahlen- oder der Chemotherapie ermöglichen würden.

Die vorliegende Arbeit hat deshalb zum Ziel, die [illegible] die Parameter zu ermitteln, mit [illegible] die im Labor für experimentelle Tumorforschung (Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich) verwendeten [illegible] (Garfano 1980) [illegible] zu bestimmen. Von besonderer Bedeutung für die Anwendbarkeit der so gewonnenen Daten in Therapie und Forschung ist es, diese ohne Störung der Beziehungen zwischen Tumor und Wirtstier zu ermitteln. Dementsprechend wurden in der vorliegenden Untersuchung überwiegend nicht-invasive in-vivo Meßmethoden angewandt, die in den vergangenen Jahren am Institut für Medizin der KFA Jülich entwickelt wurden (Feinendegen und [illegible] 1978 u. 1979). Bei diesen Techniken werden [illegible] in die Zell-DNA [illegible] und durch externe Aktivitätsmessung [illegible]

suchten Tumors und Verluste von Zellen aus dem Tumor verfolgt. Solche Messungen erlauben dann Rückschlüsse auf die zu untersuchenden tumorkinetischen Parameter ohne Störung des Tumorwachstums.

# II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Vor der experimentellen Untersuchung der Tumorkinetik soll ein System von Parametern gefunden werden, das die vollständige Beschreibung des Tumorwachstums innerhalb experimenteller Fehler erlaubt.
Das Wachstum eines Tumors ist das Ergebnis zahlreicher Vorgänge, die sich vereinfachend zu zwei einander konkurrierenden Prozessen zusammenfassen lassen: diese beiden Prozesse sind die Produktion und der Verlust von Tumorzellen, die beide während der Tumorentwicklung zahlreichen Einflüssen und damit zeitlichen Veränderungen unterworfen sein können.

## II. 1. Zellproduktion

Neue Tumorzellen entstehen aufgrund der Proliferationsfähigkeit vorhandener Tumorzellen; diese sind in der Lage, sich nach Ablauf bestimmter Prozesse zu teilen und so je zwei neue Tochterzellen zu bilden.
Die Folge der Ereignisse, die sich im Zeitraum zwischen zwei solchen Teilungen (sog. Mitosen ) abspielen, wird mit Zellzyklus bezeichnet, der mittlere zeitliche Abstand zweier Mitosen mit Zellzykluszeit ( $T_C$ ).
Seit der Entwicklung der ersten Techniken zur Markierung lebender Zellen durch Howard und Pelc (1953) wird der Zellzyklus in vier Abschnitte eingeteilt, die mit G1-, S-, G2- und M-Phasen bezeichnet werden. Mit der Trennung zweier Tochterzellen beginnt die postmitotische G1-Phase, in der bei differenzierten Zellen die speziellen Funktionen, wie zum Beispiel die Hormonsynthese, ablaufen. Während der sich anschließenden S-Phase findet die Synthese neuer DNA ( =Desoxyribonukleinsäure ) statt, durch die der ursprüngliche Gehalt an DNA verdoppelt wird; im Verlaufe der folgenden G2-Phase werden die für die nächste Mitose notwendigen Enzymsysteme synthetisiert; in der M-Phase vollzieht sich die

Teilung der Zelle in zwei neue Tochterzellen (Prescott 1969).
In Abbildung 1 ist der Verlauf des Zellzyklus schematisch dargestellt.

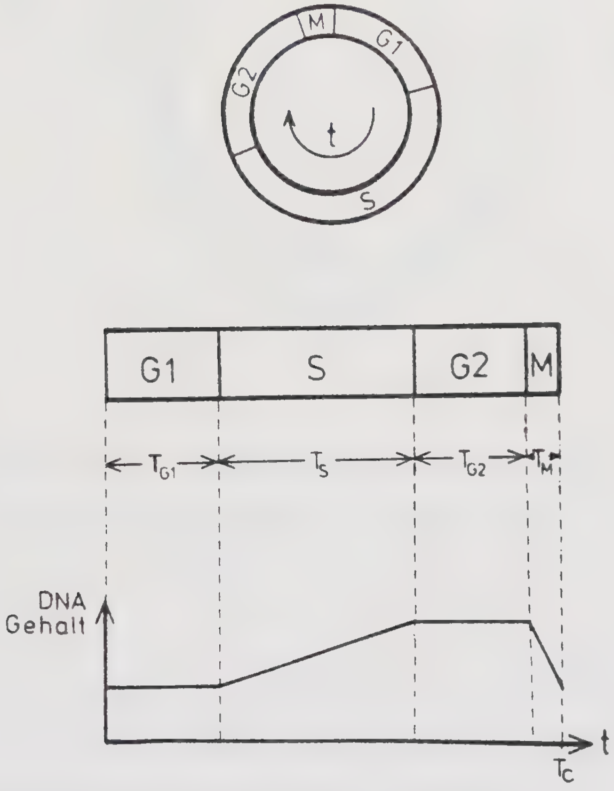



Abb. 1 Skizze des Zellzyklus, der Länge und des DNA-Gehalts der einzelnen Zyklusphasen

In diese Skizze geht die vereinfachende Annahme ein, daß alle Zellen der zu untersuchenden Population eine gemeinsame Zellzykluszeit aufweisen. Realistischer ist die Annahme einer auf die einzelnen Zellen statistisch verteilten Zyklusdauer; dies stellt Abbildung 2 dar, in der von Zelle zu Zelle unterschiedliche Dauern der einzelnen Phasen angedeutet sind. Die Breite der statistischen Verteilungsfunktion von $T_C$ ist bei verschiedenen Tumor-Wirtsystemen stark unterschiedlich. Wie jedoch eine vergleichende Untersuchung an zahlreichen Tumoren ergeben hat (Steel 1966), zeigen serientransplan-

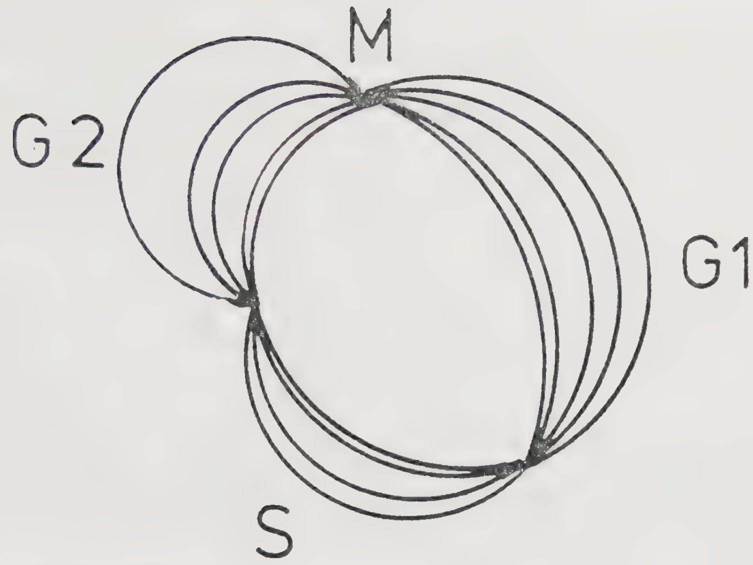



Abb. 2 Skizze des Zellzyklus einer Population mit statistisch verteilten Längen der einzelnen Zyklusphasen

tierte Experimentaltumore relativ schmale Häufigkeitsverteilungen von $T_C$, sodaß hier die Annahme einer allen Zellen gemeinsamen mittleren Zellzykluszeit gerechtfertigt scheint.
Betrachtet man ausschließlich diejenigen Zellen eines Tumors, die beständig den Zellzyklus durchlaufen, die also proliferieren, und vernachlässigt man eventuelle Verluste solcher Zellen, so kann man einen ersten Ansatz zur mathematischen Beschreibung des Wachstums einer solchen Zellpopulation aufstellen: die Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{N}_P(t)$ der Anzahl $N_P(t)$ dieser Zellen ist proportional zu $N_P(t)$ und hängt ausschließlich von der Geschwindigkeit ab, mit der die Zellen den Zellzyklus durchlaufen:

$$\dot{N}_P(t) = \frac{d}{dt} N_P(t) = k_P \cdot N_P(t) \qquad (1)$$

$k_P$, die sogenannte Zellproduktionsrate, ist die Zahl der pro Zeiteinheit und pro vorhandener proliferierender Zelle neu entstehenden Tumorzellen; sie läßt sich aus der Zellzykluszeit berechnen:

$$k_P = \frac{\ln 2}{T_C} \qquad (2)$$

Im einfachen Grenzfall konstanter Zellzykluszeit kann die Differentialgleichung (1) durch eine Exponentialfunktion gelöst werden:

$$N_P(t) = N_P(o) \cdot \exp( k_P \cdot t )$$

$$= N_P(o) \cdot \exp( \frac{\ln 2}{T_C} \cdot t )$$

$T_C$ stimmt dann mit der Zeit $T_{d,P}$ überein, die die Gruppe der proliferierenden Zellen benötigt, um ihre Größe zu verdoppeln:

$$T_{d,P} = T_C$$

Diese Übereinstimmung ist jedoch nur bei wenigen Tumoren zu finden, die Verdopplungszeit des Gesamttumors ist meist länger als die Zyklusdauer der proliferierenden Zellen. Dies ist auf Verluste von Zellen, aber auch auf die Existenz von nicht-proliferierenden Zellen im Tumor zurückzuführen. Das Vorhandensein solcher Zellen wurde durch autoradiographische Untersuchungen in zahlreichen Tumoren nachgewiesen ( Mendelsohn 1965 u. 1970, Steel 1972 ).
Hier wurde von Mendelsohn der Begriff der Wachstumsfraktion GF eingeführt, mit dem der Anteil der proliferierenden Zellen $N_P(t)$ an der Gesamtzellzahl N(t) bezeichnet wird:

$$0 \leq GF(t) = \frac{N_P(t)}{N(t)} \leq 1 \qquad (3)$$

Bezeichnet man in Analogie zu $k_P$ die Anzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit und pro vorhandener Tumorzelle neu enstehen mit k, so kann mit Hilfe der Wachstumsfraktion der Zusammenhang zwischen diesen beiden Zellproduktionsraten angegeben werden:

$$k = k_P \cdot GF \leq k_P \qquad (4)$$

Somit lautet die Differentialgleichung für die Gesamtzellzahl unter Vernachlässigung von Zellverlusten:

$$\dot{N}(t) = k_P \cdot N_P(t)$$

$$= \frac{\ln 2}{T_C} \cdot GF(t) \cdot N(t)$$

Daraus ergibt sich unter der Bedingung, daß sowohl GF als auch $T_C$ im Verlaufe der Tumorentwicklung konstant sind, ein exponentielles Wachstum der Form:

$$N(t) = N(o) \cdot \exp( k \cdot t)$$

$$= N(o) \cdot \exp( \frac{\ln 2}{T_C} \cdot GF \cdot t )$$

II. 2. Zellverluste

Dem auf der Proliferationsaktivität eines Teils der Tumorzellen beruhenden Wachstum steht konkurrierend der Verlust von Zellen aus dem Tumor gegenüber, der im wesentlichen durch zwei Mechanismen bewirkt wird:

- Zelltod, der durch Immunabwehr des Wirts, durch mangelhafte Versorgung der betroffenen Zellen mit Nährstoffen oder durch zytotoxische Wirkung bereits abgestorbener Zellen bewirkt wird
- Metastasenbildung, das heißt durch Verluste lebender Zellen in den Körper des Wirtstieres

Das Wachstum eines Tumors wird bei Berücksichtigung solcher Verluste durch die Differentialgleichung

$$\dot{N}(t) = ( \frac{\ln 2}{T_C} \cdot GF(t) - L ) \cdot N(t) \qquad (5)$$

wiedergegeben. L bezeichnet hier die über alle Tumorzellen gemittelte Verlustrate, das heißt das Verhältnis der pro Zeiteinheit verlorengehenden Zellen zur Gesamtzahl der Zellen.

Nur bei konstanten Parametern $T_C$, GF und L ergibt sich eine einfache exponentielle Lösung dieser Gleichung:

$$N(t) = N(o) \cdot \exp\left( \left( \frac{\ln 2}{T_C} \cdot GF - L \right) \cdot t \right) \qquad (6)$$

Die Verdopplungszeit berechnet sich für diesen Fall aus:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\ln 2 \cdot GF - L \cdot T_C} \cdot T_C \geq T_C \qquad (7)$$

## II. 3. Wachstumseigenschaften solider Tumore

Eine Vielzahl systematischer Untersuchungen ist an zahlreichen Tumor-Wirt-Systemen angestellt worden, um ein einheitliches Modell für die Beschreibung des Geschehens in einem Tumor zu entwickeln.

Dabei konnte nur bei wenigen Tumoren eine exponentielle Wachstumskurve N(t) gefunden werden, die auf konstante Wachstumsparameter $T_C$, GF und L hindeuten würde. In der überwiegenden Zahl der untersuchten Fälle zeigt sich nach anfänglichem, kurzem exponentiellen Anstieg ( $\dot{N}(t)/N(t) = const.$ ) eine deutliche Verringerung der relativen Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{N}(t)/N(t)$, die häufig zum Ende der Tumorentwicklung hin die Wachstumskurve in ein Plateau münden läßt ( $\dot{N}(t) = 0$ ).

Dementsprechend muß mindestens einer der genannten Parameter als zeitlich variabel angenommen werden: eine Verlängerung der Zellzykluszeit führt ebenso zu einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit wie eine Verringerung der Wachstumsfraktion oder eine Erhöhung der Zellverlustrate. Welcher dieser Einflüsse in welchem Maße zu einer geringeren relativen Wachstumsgeschwindigkeit beiträgt, hängt ab von der Art des Tumors und dem Ort des Wachstums im Organismus des Wirtstieres. So fand beispielsweise Denekamp (1972 ) bei Carcinomen hohe, bei Sarkomen jedoch niedrige Verlustraten. Vergleichende Untersuchungen von Gullino ( in : Tubiana 1971 ) und Folkman ( 1975 ) haben gezeigt, daß Zellpopulationen auf mangelhafte Nährstoffversorgung mit einer Verringerung der Wachstumsfraktion bei relativ konstanter Zykluszeit reagierten, während Populationen bei ausreichender Versorgung aber ständig steigender räumlicher Dichte der Zellen eine sich verlängernde Zellzykluszeit zeigen, die Wachstumsfraktion aber weitgehend konstant ist.

Entsprechende Arbeiten an verschiedenen Tumorsystemen ergaben für solide wachsende Tumoren konstante Zyklusdauern aber kleiner werdende Wachstumsfraktionen und steigende Verluste (Steel 1966 u.

1968, Lala 1966 u. 1971, Frindel 1967, Tannock 1968, Tubiana 1971). Ascites-Tumore zeigten demgegenüber beständig steigende Zykluszeiten bei konstanter Wachstumsfraktion (Lala 1972, Silvestrini 1972, Schiffer 1973, Andreeff 1977 ).
Die sich im Laufe der Tumorentwicklung verschlechternde Versorgungslage der Zellen scheint demnach verantwortlich zu sein für das sich verlangsamende Wachstum solider Tumore. Obwohl das Absterben von unzureichend versorgten Tumorzellen das Wachstum von Blutgefäßen beschleunigt, kann das den Tumor versorgende Gefäßsystem nicht mit dem Wachstum des Tumors Schritt halten. Dies führt dazu, daß der mittlere Abstand der Tumorzellen von den sie versorgenden nächsten Kapillaren wächst und sich so die Nährstoffversorgung verschlechtert ( Tubiana 1971, Tannock 1963 Gewehr 1977 ).
Autoradiographische Untersuchungen zeigen dementsprechend eine hohe Proliferationsaktivität, das heißt eine hohe Zahl proliferierender Zellen, in der unmittelbaren Umgebung von Kapillaren, die mit wachsendem Abstand zwischen Kapillaren und den Zellen rasch abnimmt ( Tannock 1968, Tubiana 1971 , Nishioka 1970 ). Bei solchen Untersuchungen werden Tumorzellen durch den Einbau von DNA-Vorläufern radioaktiv markiert und diese Markierung durch photographische Emulsionen nachgewiesen; eine hohe Markierungsdichte des Autoradiogramms bedeutet hohe Proliferationsaktivität, geringe Markierungsdichte eine niedrige Zahl proliferierender Zellen. In dem gleichen Maß wie die Markierbarkeit von Tumorzellen mit wachsendem Abstand von der nächsten Kapillaren abnimmt, wird auch das Verhältnis der Zellen in der Mitosephase zur Gesamtzellzahl, der sogenannte Mitoseindex, kleiner, sodaß die geringere Markierungsdichte in schlechter versorgten Tumorregionen nicht auf eine geringere Verfügbarkeit der Markierungssubstanz zurückgeführt werden kann ( Frindel 1967, Nishioka 1970).

Gleichzeitig zeigen aber Messungen der Zellzykluszeiten von soliden Tumoren keine Abhängigkeit der Zyklusdauer vom Abstand der beobachteten Zelle und der nächsten Kapillare

(Tannock 1968, Nishioka 1970). Das heißt, Zellen, deren Versorgungslage sich durch das Anwachsen des Abstands zur nächsten Kapillare verschlechtert, proliferieren mit konstanter Zykluszeit bis die Versorgung eine bestimmte Grenze unterschreitet und die Zellen die Proliferation vollständig einstellen. Bei weiterer Verschlechterung ihrer Nährstoffversorgung sind die betroffenen Zellen nicht mehr lebensfähig und sterben ab. Die abgestorbenen Zellen werden nur teilweise abtransportiert, ihre Reste bilden die sogenannten Nekrosezonen, die durch zytotoxische Wirkungen auf die noch lebenden Zellen zu einer Erhöhung der Zellverluste beitragen können.

Die hier skizzierte Entwicklung eines soliden Tumors ist in Abbildung 3 dargestellt ( Tannock 1968, Jentzsch 1976 ). Messungen von Nishioka ( 1970 ) bestätigen dieses Bild für das Sarkom-180 der C3H-Maus.

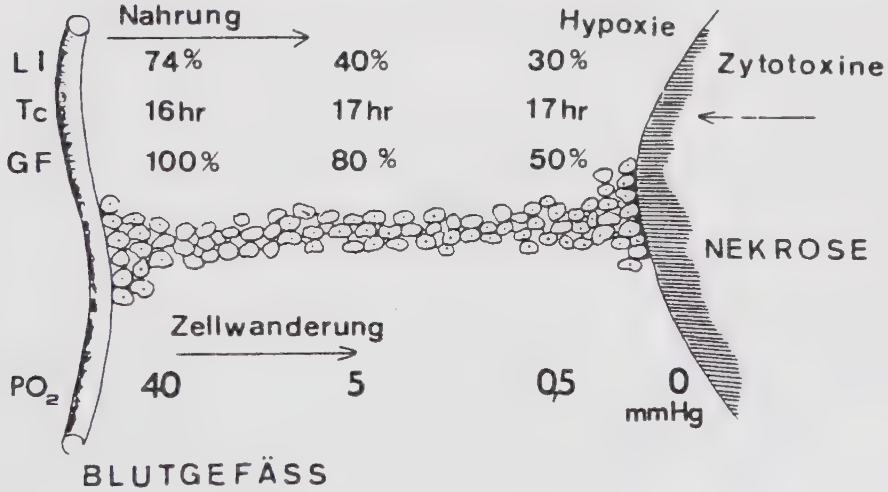



Abb. 3 Abhängigkeit der Proliferationsaktivität in einem soliden Tumor vom Abstand der Zellen von der Kapillare (LI = sog. Markierungsindex = Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzellzahl).

Für einen soliden Tumor, wie er in dieser Arbeit untersucht werden soll, liegt demnach die in Abbildung 4 dargestellte vereinfachende Beschreibung nahe: die Zellen des Tumors werden je einer von drei Zellgruppen zugeordnet, den proliferierenden P-Zellen, den ruhenden Q-Zellen oder der Nekrose. Durchgezogene Linien in Abbildung 4 bezeichnen Übergänge von Zellen zwischen den einzelnen Zellgruppen und zum Wirt ( Zellverluste ), unterbrochene Linien deuten Einflüsse des Wirts und der Tumorentwicklung auf die verschiedenen Wachstumsparameter an.

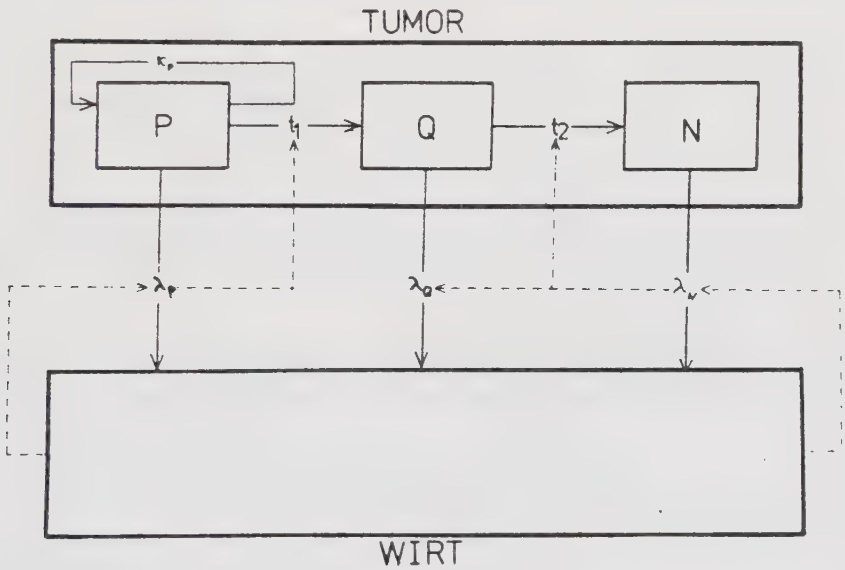



Abb. 4 Einteilung der Tumorzellen in proliferierende (P-) ruhende ( Q-) und nekrotische ( N-) Zonen

Die Entwicklung eines Tumors, der in dieser vereinfachten Form beschrieben wird, wird durch drei lineare, gekoppelte Differential-gleichungen 1. Ordnung wiedergegeben:

$$\dot{N}_P(t) = k_P \cdot N_P(t) - t_1 \cdot N_P(t) - \lambda_P \cdot N_P(t)$$

$$\dot{N}_Q(t) = t_1 \cdot N_P(t) - t_2 \cdot N_Q(t) - \lambda_Q \cdot N_Q(t) \qquad (8)$$

$$\dot{N}_N(t) = t_2 \cdot N_Q(t) - \lambda_N \cdot N_N(t)$$

Wegen

$$N(t) = N_P(t) + N_Q(t) + N_N(t) \qquad (9)$$

und der in Gleichung (3) gegebenen Definition der Wachstums-fraktion GF

$$GF(t) = \frac{N_P(t)}{N(t)} = \frac{N_P(t)}{N_P(t) + N_Q(t) + N_N(t)}$$

gilt für die Wachstumsgeschwindigkeit des Gesamttumors:

$$\dot{N}(t) = k_P \cdot N_P(t) - \lambda_P \cdot N_P(t) - \lambda_Q \cdot N_Q(t) - \lambda_N \cdot N_N(t)$$

$$= \frac{\ln 2}{T_C} \cdot GF(t) \cdot N(t) - L(t) \cdot N(t) \qquad (10)$$

Hierbei bedeuten:

| | |
|---|---|
| $N(t)$ | die Gesamtzahl aller zur Zeit t vorhandenen Zellen |
| $N_P(t)$ | die Zahl der zur Zeit t proliferierenden Zellen |
| $N_Q(t)$ | die Zahl der zur Zeit t ruhenden Zellen |
| $N_N(t)$ | die Zahl der "Zellen" in der Nekrosezone |
| $k_P$ | die Zellproduktionsrate der P-Zellen |
| $t_1$ | die relative Anzahl der P-Zellen, die pro Zeiteinheit zur Gruppe der Q-Zellen übergehen |
| $t_2$ | die relative Anzahl der Q-Zellen, die pro Zeiteinheit zur Nekrose übergehen |

$\lambda_P$ die relative Anzahl der P-Zellen, die pro Zeiteinheit den Tumor verlassen

$\lambda_Q$ die relative Anzahl der Q-Zellen, die pro Zeiteinheit den Tumor verlassen

$\lambda_N$ die relative Anzahl der N-Zellen, die pro Zeiteinheit den Tumor verlassen

L die mittlere Zellverlustrate, d. h. die mittlere, relative Anzahl aller Tumorzellen, die pro Zeiteinheit den Tumor verlassen

GF(t) den Anteil der P-Zellen am Gesamttumor

$T_C$ die Zellzykluszeit

Zwischen L(t) und den Verlustraten der drei Zellgruppen besteht die Beziehung:

$$L(t) = \frac{\lambda_P \cdot N_P(t) + \lambda_Q \cdot N_Q(t) + \lambda_N \cdot N_N(t)}{N_P(t) + N_Q(t) + N_N(t)} \qquad (11)$$

Das Gleichungssystem (8) berücksichtigt Einflüsse der Tumorgröße und des Wirts auf die tumorkinetischen Parameter, indem diese als Zeit- oder Tumorgrößen-abhängig angenommen werden. Annahmen über die Art oder die mathematische Form dieser Einflüsse gehen hier nicht ein. So ist das genannte Differentialgleichungssystem nicht das einzige, das das Geschehen in einem soliden Tumor beschreibt. Es sind andere Systeme und Gleichungen vorstellbar, die sich aus sinnvollen Ansätzen zur Beschreibung der genannten Einflüsse ergeben. Die Gleichungen (8) beziehungsweise (10) sind jedoch die einfachsten, die einen entsprechend der Abbildung 4 vereinfachten Tumor beschreiben. Die genannten Differentialgleichungen enthalten einige Vereinfachungen, sodaß ihre Anwendbarkeit bestimmten Einschränkungen unterliegt:

1. Die wesentliche Vereinfachung besteht in der Verwendung scharf definierter Zykluszeiten anstelle von kontinuierlichen Übergängen zwischen proliferierenden und ruhenden Zellen: P-Zellen wird

eine endlich-lange, Q-Zellen eine unendlich-lange Zellzykluszeit zugeordnet. Dieses Vorgehen hat sich in zahlreichen Untersuchungen und Experimenten bewährt (Mendelsohn 1964 u. 1970, Steel 1966 u. 1968, Simpson-Herren 1968 u. 1970, Tannock 1968, Tubiana 1971, Hermens 1973); es stützt sich auf Ergebnisse autoradiographischer Bestimmungen von $T_C$. Für diese Methode gilt jedoch die Einschränkung, daß Zellen, deren Zyklusdauern wesentlich länger sind als die mittlere des Gesamttumors, autoradiographisch nicht von nicht-proliferierendenZellen unterschieden werden können. Dies setzt allerdings auch voraus, daß der Anteil dieser Zellen gering ist, da sonst die mittlere Zykluszeit durch die Beiträge dieser Zellen zu höheren Werten hin verschoben wird. Das bedeutet, daß solche Zellen, falls sie existieren, keinen nennenswerten Einfluß auf das Wachstum des Tumors ausüben, da sie wegen ihrer geringen Anzahl und ihrer höheren Zyklusdauer nur wenig zum Wachstum beitragen.

2. Übergänge von ruhenden Q-Zellen zu P-Zellen, also eine Wiederaufnahme der Proliferationstätigkeit, sind in Abbildung 4 nicht berücksichtigt, gehen jedoch in die weitere Rechnung durch eine entsprechende Verringerung von $t_1$ ein. Solche Übergänge sind von besonderer Bedeutung für Tumore, die einer Strahlentherapie unterworfen werden: durch die höhere Strahlenempfindlichkeit proliferierender Zellen ( Pittner 1973, Porschen 1974, Gewehr 1977) werden überwiegend diese geschädigt, während bis dahin ruhende (weil schlecht versorgte) Zellen durch das Absterben von P-Zellen teilweise wieder gut versorgt werden, ihre frühere Proliferationsaktivität wieder aufnehmen und das weitere Tumorwachstum neu einleiten. Dieser Effekt wird mit Reoxygenierung bezeichnet; er macht deutlich, von welcher Bedeutung die Kenntnis von GF für die Planung von Strahlentherapien ist.

# III. MATERIAL UND METHODEN

## III. 1. Tumorsystem

### III. 1. 1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Albinomäuse vom Stamm NMRI (Lippische Versuchstierzucht Hageman, Extertal). Das mittlere Alter bei Beginn der jeweiligen Experimente lag bei 8-12 Wochen, das mittlere Gewicht zwischen 20 und 30 Gramm. Die Tiere wurden in Kunststoffkäfigen zu je 5 Mäusen gehalten und mit Altromin 1115 im Überschuß ernährt.

Um eine gegenseitige Kontamination der Tiere bei Untersuchungen zu vermeiden, die die Verwendung radioaktiver Substanzen erforderten, wurde die Streu der Käfige täglich erneuert. Bei solchen Experimenten wurde außerdem das Trinkwasser 2 Tage vor Versuchsbeginn durch eine 0,1 %-ige NaJ-Lösung ersetzt, um Jod-Speicher im Körper abzusättigen.

### III. 1. 2. Tumor

Das hier untersuchte Sarkom-180 wird seit etwa 10 Jahren am Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich unter konstanten Bedingungen serientransplantiert. Es ist ein solide wachsender Tumor, der durch subkutane Injektion von ca. $3 \cdot 10^5$ lebenden Tumorzellen in das rechte Hinterbein des Versuchstieres übertragen wird. Der Anteil der Tiere, die daraufhin keine Tumorentwicklung zeigen, liegt unter 10%.

Das Sarkom-180, auch mit Crocker Sarkom-180 bezeichnet, wurde 1914 als Spontantumor einer weißen, männlichen Maus entdeckt. (Crocker Laboratories, New York, heute Columbia). Es wurde als Carcinom diagnostiziert, das ursprüngliche Gewebe war jedoch nicht bekannt. Serientransplantationen ergaben einen Tumor, dessen histologisches Erscheinungsbild dem eines Sarkoms entspricht und das sich seitdem nicht wesentlich geändert hat (Atlas of Tumor Pathology Set XII, Fascicle 40).

### III. 1. 3. Transplantationstechnik

Wöchentlich werden aus einer Woche alten Tumoren die zur Weitertransplantation benötigten Zellen gewonnen. Die Zahl der für diese Transplantation zu tötenden Spendertiere beträgt 1/10 der Anzahl der für das betreffende Experiment benötigten Mäuse. Die Tiere werden durch Genickbruch getötet und die Tumoren aus dem desinfizierten Hinterbein steril entnommen. Diese werden mit sterilen Scheren zerkleinert und in gekühltem Fisher's Medium gesammelt. Dabei lösen sich zahlreiche Einzelzellen. Diese Suspension wird nach ca. 1/2 Stunde durch ein Netzfilter filtriert. Eine Probe wird entnommen, um mit Hilfe einer Färbung mit 0,2%-igem Trypanblau den Anteil geschädigter und toter Zellen feststellen zu können. Dem Ergebnis dieser Zählung entsprechend wird die Suspension weiter verdünnt. Injiziert werden 0,1 bis 0,2 ml dieser Suspension mit ca. 300 000 lebenden Zellen in das rechte Hinterbein des Versuchstieres, das zuvor mit Methanol desinfiziert wurde.

## III. 2. Meßmethoden

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik eines Tumors müssen neben der Tumorgröße die wesentlichen Parameter, also Zellzykluszeit, Wachstumsfraktion und Zellverlustrate, in ihrer Abhängigkeit vom Tumoralter verfolgt werden. Um die Entwicklung eines ungestörten Tumors beobachten zu können, ist es von größter Bedeutung, bei den hierzu durchzuführenden Experimenten nicht in die Beziehungen zwischen Tumor und Wirt einzugreifen. Es müssen also so weit als möglich nicht-invasive Meßmethoden am lebenden Tier angewandt werden. Außerdem liefert eine invasive Messung, also eine Messung, die die Tumor-Wirt-Beziehungen stört, Aussagen lediglich für den einen Zeitpunkt, zu dem das Experiment durchgeführt wurde; weitere Messungen an dem selben Tumor sind meist nicht möglich. Das heißt, nicht-invasive Meßmethoden erfordern einen deutlich geringeren experimentellen Aufwand und ermöglichen es vor allem, Tumore über die gesamte Dauer ihrer Entwicklung zu beobachten.

### III. 2. 1. Invasive Messungen: Autoradiographische Bestimmung der Zellzykluszeit

Die Bestimmung der Zellzykluszeit $T_C$ kann mit ausreichender Genauigkeit nur invasiv erfolgen. Die exaktesten Ergebnisse erhält man durch autoradiographische Methoden, die neben $T_C$ zahlreiche weitere Informationen zur Zellkinetik liefern. Ebenso gute Ergebnisse erzielt man mit Hilfe neuer cytophotometrischer Methoden, die jedoch die Anwendbarkeit spezieller tumorkinetischer Modelle voraussetzen. Autoradiographische Techniken sind die einzigen, die es erlauben, Stoffwechseluntersuchungen in zellulären Bereichen durchzuführen, bei denen die Zellstrukturen erhalten bleiben (Schultze 1967). Sie liefern neben der Länge der einzelnen Zyklusphasen Informationen über die Proliferationsaktivität und, bei Verwendung eines geeigneten Modells, über Zellverluste (Steel 1968 ).

Ausführliche Beschreibungen der Grundlagen dieser wichtigen zellkinetischen Methoden finden sich bei Leblond (1959), Schultze (1967), Feinendegen ( 1967 ) und Cleaver ( 1967 ).
Autoradiographische Methoden zur Ermittlung von $T_C$ beruhen auf dem Einbau radioaktiv-markierter Substanzen (meist mit H-3 oder C-14 markiertes Thymidin, H-3-TdR bzw. C-14-TdR) in die DNA von Zellen während der S-Phase und dem Nachweis der emittierten Strahlung durch die Schwärzung photographischer Emulsionen.
Der Einbau der Markierungssubstanz in eine Gruppe von Zellen ermöglicht es, die Entwicklung dieser zunächst annähernd synchron den Zellzyklus durchlaufenden Zellgruppe zu beobachten. Es wird ein möglichst enges Zeitintervall des Zellzyklus gewählt und das Durchwandern der Gruppe der markierten Zellen durch dieses Intervall verfolgt. Für dieses Zeitintervall bietet sich die Mitosephase an, da Zellen in dieser Phase morphologisch eindeutig von Zellen anderer Zyklusphasen unterschieden werden können.
Bei der hier verwandten sogenannten PLM-Technik (PLM = Percent labeled mitoses) werden die Versuchstiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion der markierenden Substanz getötet, die Tumoren entnommen, Zellen auf Objektträger gebracht und mit einer Filmemulsion bedeckt. Im Verlaufe der sich anschließenden Expositionszeit emittieren die in den Zellkernen gebundenen Radionuklide Strahlung; diese schwärzt den Film und erlaubt es so, markierte von nicht-markierten Zellen zu unterscheiden.
Die Dauern der einzelnen Zellzyklusphase ergeben sich dann aus der Abhängigkeit des mikroskopisch auszählbaren Anteils der markierten Mitosen an deren Gesamtzahl von der Zeit $\Delta t$ zwischen der Injektion und der Entnahme der Tumorzellen: bei $\Delta t = 0$ sind keine Mitosen markiert, erst wenn $\Delta t$ größer wird als die Dauer $T_{G2}$ der G2-Phase, erreichen die in der S-Phase markierten Zellen die Mitosephase; das heißt, jetzt sind markierte Mitosen zu finden, deren Anteil an der Gesamtzahl aller Mitosen dann ansteigt, bis diese sogenannte

PLM-Kurve bei $\Delta t = T_{G2} + T_M$ ein Plateau erreicht. Dessen Dauer entspricht der Länge der S-Phase abzüglich der Dauer der Mitose. Die Zeit, die die markierten Zellen benötigen, um vollständig diese Mitosephase zu durchlaufen, beträgt $T_S + T_M$, danach ist der Anteil der markierten Mitosen wieder gleich Null. Es ergibt sich also der in Abbildung 5 skizzierte Verlauf der PLM-Kurve; diese liefert Werte für $T_C$, $T_S$ und einen Mindestwert für $T_{G2}$. Dies gilt auch, wenn nicht alle Zellen den Zyklus durchlaufen, das heißt, wenn GF kleiner als 1 ist. Diese Methode ist also vielseitig anwendbar, ihr Nachteil besteht jedoch in dem sehr hohen Aufwand für die Zellpräparation und die Auszählung der Mitosen am Mikroskop.

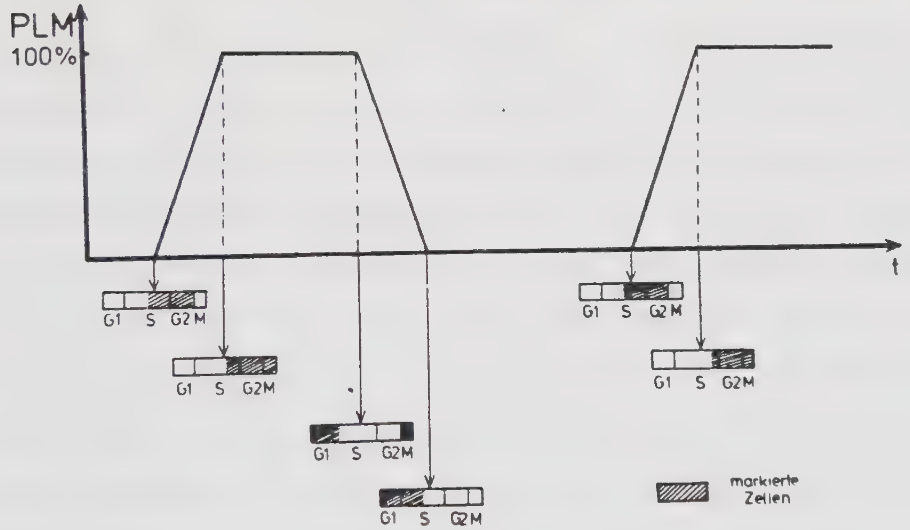



Abb. 5 Entstehung einer (idealisierten) PLM-Kurve durch die "Wanderung" einer Gruppe markierter Zellen durch den Zellzyklus

Abbildung 5 verdeutlicht das Wandern der Gruppe markierter Zellen durch den Zyklus; sie zeigt die sich daraus ergebende PLM-Kurve in einer idealisierten Form. Daß diese im realen Experiment nicht

gefunden wird, ist darauf zurückzuführen, daß die Zellen nicht alle exakt die gleiche Zykluszeit besitzen, sondern daß diese einer statistischen Verteilung mit einer gewissen Breite unterworfen ist. Das hat zur Folge, daß die Zellen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten den Zellzyklus durchlaufen und so die Gruppe der markierten Zellen immer weiter auf den gesamten Zyklus verteilt wird, sie wird desynchronisiert. Außerdem scheiden während der Untersuchungsdauer Zellen aus dem Zyklus aus, entweder durch Verluste oder durch Übergänge zur Gruppe der nicht-proliferierenden Zellen. Beide Effekte führen dazu, daß die PLM-Kurve nur in seltenen Fällen die 100% - Maxima erreicht und daß aufeinander folgende Gipfel niedriger und Täler weniger ausgeprägt werden. Die Zahl der erkennbaren Gipfel hängt stark vom untersuchten Tumor und dessen Alter ab. Mit zunehmendem Alter gewinnt die $T_C$-Verteilung an Breite, es wird schwieriger, den 2. Gipfel signifikant zu identifizieren. Steel (1966 u. 1972 ) untersuchte und verglich die PLM-Kurven zahlreicher Transplantations- und Spontantumore. Es zeigt sich, daß über lange Zeiträume serientransplantierte Experimentaltumore meist zwei gut identifizierbare Gipfel zeigen und eine schmale $T_C$-Verteilung aufweisen; bei Spontantumoren läßt sich selten ein zweiter Gipfel erkennen, die Zellzykluszeit-Verteilungen sind sehr breit. Dies hat zur Entwicklung zahlreicher Modelle und Computerprogramme zur Auswertung von PLM-Kurven geführt (Barrett 1966, MacDonald 1970, Mendelsohn 1971, Steel 1971 u. 1972, Jannsson 1974). Alle diese Modelle gehen von verschiedenen theoretischen Ansätzen aus, so werden zum Beispiel bestimmte mathematische Formen der Verteilungsfunktion von $T_C$ vorausgesetzt oder Verteilungsfunktionen der Zellen über den Zellzyklus vorgegeben. Da die auf diesem Wege in die Auswertung der PLM-Kurven eingehenden Voraussetzungen, wie konstante Zellzykluszeit oder konstante Wachstumsfraktion, hier gerade überprüft werden sollen und da die bei den verschiedenen Autoren auftretenden Unterschiede in der Größenordnung der experimentellen

Fehler liegen, ist es sinnvoll, anstelle dieser sehr aufwendigen Verfahren die PLM-Kurven einfacher graphisch auszuwerten (Simpson-Herren 1970). Bei dieser Methode wird aus dem Zeitpunkt, zu dem die ersten markierten Mitosen auftreten, die minimale Dauer der G2-Phase ermittelt; aus der Breite des ersten Gipfels, also aus dem Abstand der Punkte, in denen der Anstieg beziehungsweise der Abfall 50% des Maximums erreicht, ergibt sich die Dauer der S-Phase, die Länge des gesamten Zyklus entnimmt man aus dem Abstand der beiden 50%-Marken der Anstiege des ersten und des zweiten Gipfels. Die Verwendung dieser genannten Punkte der PLM-Kurve zur Bestimmung der einzelnen Phasendauern vernachlässigt die inhomogene Verteilung der Zykluszeiten auf die Zellpopulation. Da die bekannten Messungen von $T_C$-Verteilungen (Denekamp 1970) meist unsymmetrische Verteilungsfunktionen ergaben, deren Mittelwert $\bar{T}_C$ größer ist als der wahrscheinlichste Wert für $T_C$, führt diese Vernachlässigung zu einer Überschätzung der Zyklusdauer aufgrund der Tatsache, daß die Asymmetrie der Verteilungsfunktion sich unterschiedlich auf die beiden ansteigenden Flanken der beiden Gipfel auswirkt. Wegen der zunehmenden Breite der $T_C$-Verteilung wirkt sich dieser Fehler stärker bei älteren als bei jüngeren Tumoren aus.

## III. 2. 2. Nicht-invasive Methoden

### III. 2. 2. a) Bestimmung der Tumorgröße

In der bisherigen Betrachtung wurde die Größe eines Tumors durch die Zahl N(t) der in ihm vorhandenen Zellen wiedergegeben. N(t) ist aber in der Praxis kaum, in keinem Fall aber nicht-invasiv zu bestimmen. Es ist also eine andere Meßgröße zu wählen, die das Wachstum eines Tumors widerspiegelt. Es bietet sich hier bei Experimentaltumoren an Extremitäten das Tumorvolumen an, das wegen der einfachen Geometrie und der Position des Tumors im Wirt leicht nicht-invasiv bestimmt werden kann: es wird mit Hilfe einer Schublehre der Durchmesser des Tumors in zwei zuein-

ander senkrechten Ebenen gemessen, diese Werte werden gemittelt und unter der noch zu überprüfenden Annahme eines kugelförmigen Tumors ergibt sich das Tumorvolumen aus:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3$$

An dem so berechneten Wert sind noch Korrekturen anzubringen, die die Dicke des mitgemessenen Fells, Knochens und Muskels, also des gesunden Beins berücksichtigen. Die Formel, die sich für die Berechnung von V(t) bewährt hat, lautet dann :

$$V(t) = 0,52 \cdot d^3 - 50 \qquad (11)$$

(Porschen 1969 ). V(t) wird hierbei in $mm^3$, der Durchmesser d in mm angegeben. Für diese Messung ist es von Bedeutung, daß sie im Verlaufe eines Experimentes immer von ein und derselben Person durchgeführt wird, um subjektive Schwankungen auszuschließen.

Die Meßfehler bei der Bestimmung von d betragen etwa 1mm, das entspricht bei Durchmessern von 10 bis 20 mm einem relativen Fehler von 5 bis 10 %; der dadurch bedingte Fehler von V(t) beträgt demnach 15 bis 30%.

### III. 2. 2. b) IUdR - Technik : Bestimmung der Proliferationsaktivität eines Tumors und der Aktivitätsverlustrate

P r i n z i p

Die am Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich entwickelte IUdR - Technik ( Porschen und Feinendegen 1969 ) ermöglicht es, eine bestimmte Gruppe von Zellen im Tumor zu markieren und deren Entwicklung nicht-invasiv und in-vivo über mehrere Tage hinweg zu verfolgen.

Dazu wird den Versuchstieren Jod-Desoxyuridin (IUdR ) injiziert ( intravenös oder intraperitoneal ), das von DNA-synthetisierenden Zellen, also von proliferierenden Zellen in der S-Phase, spezifisch

in die Zell-DNA eingebaut wird. Dort ist diese Verbindung biologisch stabil gebunden und geht nur bei Zelltod verloren (Commerford 1965 ). Wird nun das den Tieren injizierte IUdR zuvor mit einem instabilen Jod-Isotop (J-125, J-131 ) radioaktiv markiert, so führt der Einbau des IUdR in die Zell-DNA zu einer Markierung der synthetisierenden Zellen, die durch einfache Detektoren für Photonenstrahlung extern nachgewiesen werden kann. Die in die DNA eingebaute Aktivitätsmenge ist proportional zur angebotenen Menge (Dethlefsen 1969 ), sie liegt in der Größenordnung von einigen Prozent des Angebots (Feinendegen 1966 u. 1967, O'Farrell 1967, Heiniger 1970, Gewehr 1977 ). Durch diesen relativ geringen Prozentsatz, der allerdings für verschiedene Tumor-Wirt-Systeme sehr unterschiedlich sein kann, wird (z.B. durch Zelltod ) wieder freiwerdendes IUdR nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit in einer anderen Zelle wiederverwertet ( Hughes 1964, Commerford 1965, Feinendegen 1966, Begg 1977 ).

Jod-Desoxyuridin

5-Jod-Desoxyuridin wird als Thymidinanalog spezifisch in die Zell-DNA synthetisierender Zellen eingebaut (Prusoff 1960, Hughes 1964, Fox 1965, Feinendegen 1967 ). Es unterscheidet sich von Thymidin dadurch, daß die Methylgruppe des Thymidins ( r = 2,0 Å ) durch ein Jodatom ( r = 2,2 Å ) ersetzt ist (Abbildung 6). Diese Veränderung des Moleküls führt dazu, daß es wie Thymidin als DNA-Vorläufer in Zell-DNA eingebaut wird, daß dies aber in geringerem Maße geschieht als der Einbau von Thymidin. Die dadurch bewirkte geringere Wiederverwertung von wieder frei werdendem IUdR verbessert die Aussagekraft von Langzeitexperimenten im Vergleich zur Verwendung markierten Thymidins (Feinendegen 1967, O'Farrell 1967, Ertl 1970, Heiniger 1970 ). Zur Markierung eignen sich verschiedene instabile Jodisotope; für Tierexperimente werden vornehmlich J-125 und J-131 verwendet. Abbildung 7 zeigt das Zerfallsschema von J-125, das durch

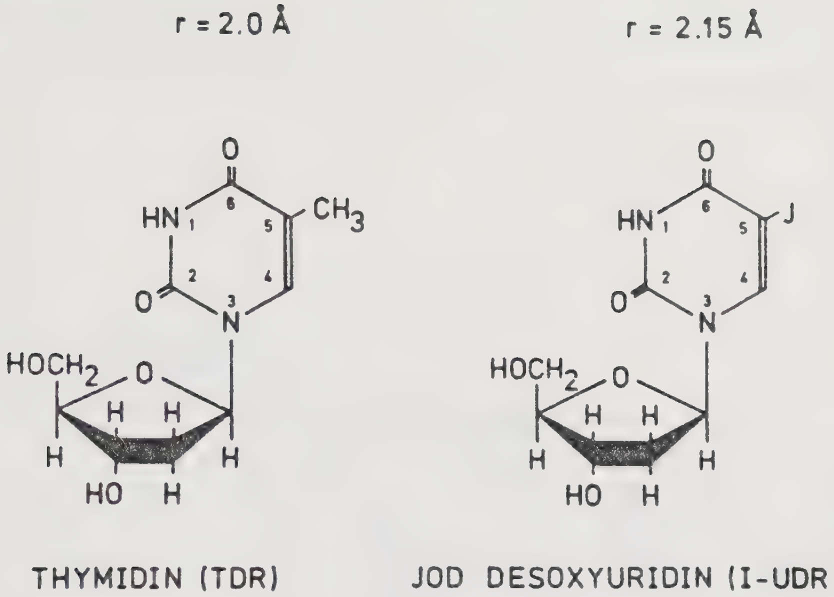



Abb. 6 Strukturformel von Thymidin und Jod-Desoxyuridin

Elektroneneinfang mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen in einen angeregten Zustand des Tellur-125 zerfällt. Die Halbwertszeit dieses Zustands beträgt 1,6 nsec für den Übergang zum Grundzustand; die dabei emittierte Photonenstrahlung hat eine Energie von 35,4 keV.

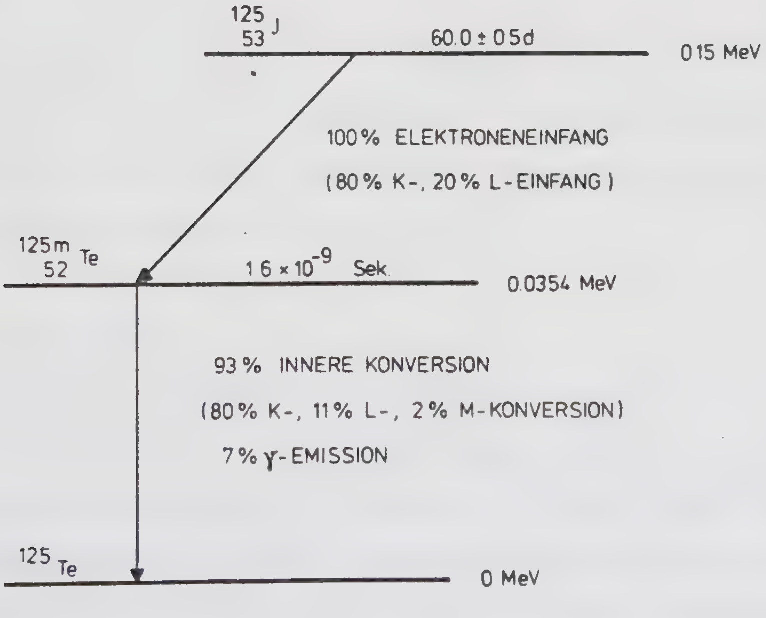



Abb. 7 Zerfallsschema von J-125

Diese Energie wird jedoch bei 93 % der Übergänge durch innere Konversion auf die Elektronenhülle des Jodatoms übertragen und führt so zur Emission von Röntgenstrahlungen verschiedener Energien.

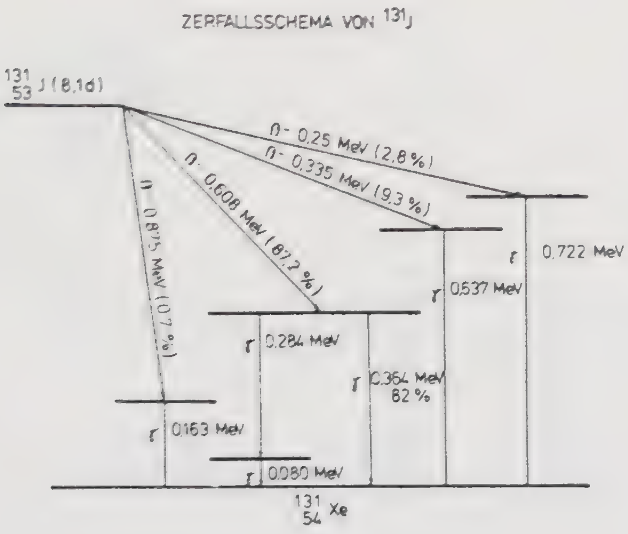



Abb. 8 Zerfallsschema von J-131

J-131 zerfällt über $\beta^-$-Zerfall zum Xenon-131 mit einer Halbwertszeit von 8,1 Tagen; hier werden 5 metastabile Zustände bevölkert ( Abbildung 8 ), die mit unterschiedlichen Lebensdauern durch $\gamma$-Emission zum Grundzustand übergehen. 82% der gesamten $\gamma$-Strahlung hat eine Energie von 364 keV.

Aktivitätsmessung

Die in einem Tumor gebundene Aktivität wird nicht-invasiv gemessen mit Hilfe des von Porschen und Feinendegen (1969) entwickelten Tumormeßplatzes (Abbildung 9 ). Hier wird die aus dem Tumor emittierte Photonenstrahlung in einem NaJ-Szintillationszähler nachgewiesen, der gegen die Strahlung aus dem Körper des Versuchstieres durch eine Bleiplatte abgeschirmt ist. Der an den Szintillationskristall angeschlossene Photovervielfacher liefert Spannungspulse, deren Höhe

proportional zur Energie der einfallenden Strahlung ist. Diese Pulse werden verstärkt, durch einen Einkanaldiskriminator analysiert und anschließend während einer vorwählbaren Zeitspanne gezählt.

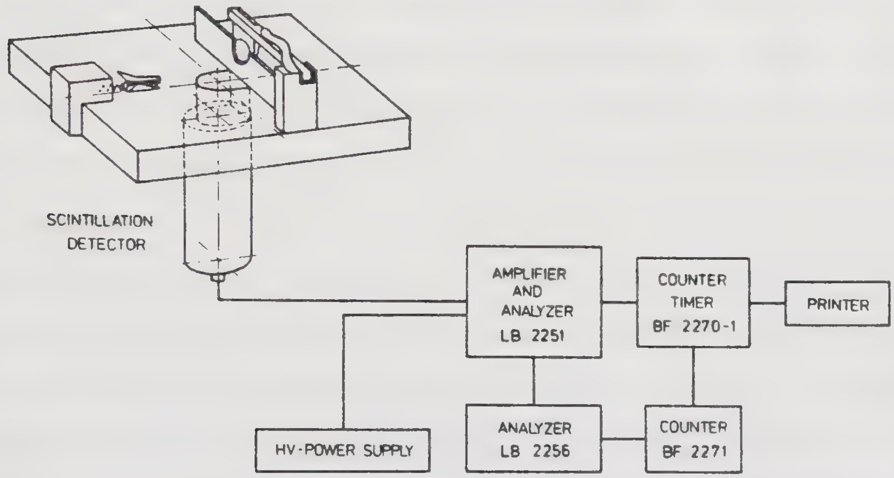



Abb. 9 Skizze des Tumormeßplatzes (nach Porschen und Feinendegen)

Die so gewonnene Zählrate ist ein direktes Maß für die im Tumor eingebaute Aktivitätsmenge; hierbei ist jedoch zu beachten, daß die Messung an verschieden großen Tumoren bei unterschiedlicher Meßgeometrie und Eigenabsorption durchgeführt wird und sich daher die Ausbeute des Meßplatzes verändert. Dies ist durch entsprechende Korrekturen zu berücksichtigen.

Anwendungen der IUdR-Technik

Die Bedeutung der IUdR-Technik liegt in der Möglichkeit, mehrere interessierende Parameter nicht-invasiv und in-vivo untersuchen zu können; vor allem für den quantitativen Vergleich der Wirkungen verschiedener Tumortherapien hat sich ihre Anwendung bewährt.

Prinzipiell sind zwei Anwendungsmöglichkeiten der IUdR-Technik zu unterscheiden:

-die Untersuchung der Proliferationsaktivität des Tumors (sog. Einbauratenmessung)

-die Untersuchung von Aktivitätsverlusten.

Die Messung der Einbaurate beginnt mit der Injektion von IUdR; nach Abschluß des Einbaus in die Tumor-DNA (nach ca. 30 min) wird die nicht eingebaute Aktivität ausgeschieden. Nach 48 Stunden finden sich 80-90% der in den Tumor eingebauten Aktivität im DNA-Protein-Komplex. Die vom Tumor ausgehende Strahlungsintensität wird dann am Tumormessplatz 48-72 Stunden nach Injektion gemessen, auf Selbstabsorption, unterschiedliche Meßgeometrie und natürlichen Jod-Zerfall korrigiert und die im Tumor vorhandene Aktivität anhand der bekannten Ausbeute der Meßanordnung berechnet. Die eingebaute Aktivitätsmenge hängt ab von der Zahl der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase befanden, und von der Menge der radioaktiven Substanz, die eine einzelne synthetisierende Zelle einbaut. Unter ungestörten Bedingungen, also zum Beispiel ohne Störung des Zellzyklus durch eine Strahlentherapie, liefert die eingebaute Aktivitätsmenge, die Einbaurate, ein relatives Maß für die Zahl der proliferierenden Zellen im Tumor (Mak 1963). Voraussetzung hierfür ist, daß der Anteil der Zellen in der S-Phase an der Gesamtzahl aller proliferierenden Zellen konstant bleibt oder bekannt ist.

Zur Bestimmung von Aktivitätsverlustraten wird ebenfalls 48 Stunden nach der Injektion von IUdR mit Messungen am Tumormeßplatz begonnen; diese werden in regelmäßigen Abständen über mehrere Tage hinweg wiederholt. Das Ergebnis solcher Meßreihen sind Aktivitätskurven, aus deren Steigung die Abnahme der im Tumor gebundenen Aktivität berechnet werden kann (Porschen 1969).

Die so bestimmte Aktivitätsverlustrate $L_{akt}$ stimmt unter den folgenden Bedingungen mit der Zellverlustrate L überein:

-die durch den Einbau des markierten IUdR beobachtete Gruppe von Zellen ist repräsentativ für den gesamten Tumor

-die beim Tod einer Zelle frei werdende Aktivitätsmenge wird voll-

ständig aus dem Tumor ausgeschieden.
-die Wiederverwertung freigewordenen IUdR´s durch DNA-synthetisierende Zellen ist vernachlässigbar klein.
Diese Verlustratenmessung findet vor allem Anwendung bei der vergleichenden Untersuchung verschiedener Tumortherapien; mit Hilfe der IUdR-Doppelmarkierungstechnik lassen sich hier zusätzlich die Wirkungen von Therapien auf unterschiedlich versorgte Regionen der Tumorzellpopulation unterscheiden (Bosiljanoff 1976, Weber 1976, Gewehr 1977). Dies gelingt durch die getrennte Markierung des gesamten Tumors und der P-Zellen mit verschiedenen Jod-Isotopen. Diese Untersuchungen ergaben unter anderem, daß die Markierung proliferierender Zellen zunächst ausschließlich in der Nähe der sie versorgenden Kapillaren stattfindet, daß also zu diesem Zeitpunkt nur gut versorgte Zellen markiert sind. Erst nach etwa 50 Stunden sind diese Zellen durch die Proliferationstätigkeit des Tumors teilweise in weniger gut versorgte Regionen gedrängt worden, sodaß jetzt die markierten Zellen annähernd gleichmäßig über den Gesamttumor verteilt sind.

# IV. MESSUNGEN, ERGEBNISSE UND DISKUSSION

## IV. 1. Invasive Messungen

### IV. 1. 1. Bestimmung der Zellzykluszeit

Die autoradiographische Bestimmung der Zellzykluszeit $T_C$ wurde an Suspensionen von Tumorzellen durchgeführt, da hier Zellen aus allen Regionen des Tumors zu finden sind und diese einen repräsentativen Querschnitt der gesamten Tumorzellpopulation bilden. Gegenüber der Verwendung solider Schnitte des zu untersuchenden Tumors bedeutet dies jedoch den Verzicht auf Informationen über die räumliche Verteilung der Proliferationsaktivität und der Zellzykluszeit im Tumor. Gleichzeitig vermeidet man jedoch so zusätzliche Fehlerquellen wie das Übereinanderliegen von Zellen und die schwierigere Identifikation von Mitosen ( Simpson-Herren 1968). Bei der hier angewandten Pulsmarkierungstechnik wurden bei verschiedenen Tumorgrößen am 5., 7. und am 12. Tag nach Implantation des Tumors je 150 (5. und 7. Tag ) bzw. 100 (12. Tag) Mäusen je 5 µCi/g Körpergewicht H-3-Thymidin intravenös in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung injiziert. In 1 bis 2 stündigem Abstand wurden je 3-5 Tiere getötet, die Tumoren entnommen, eine Suspension hergestellt, wie sie auch zur Transplantation der Tumore verwandt wird; und diese fixiert, mehrfach gewaschen und weiter fixiert. Anschließend wurden die Zellen auf je 10 Objektträger pro Meßpunkt ausgestrichen. In der Dunkelkammer wurden diese dann in eine Filmemulsion eingetaucht (sogenannte Dipping-Technik, Emulsion : G5, Ilford Ltd. Essex ), 24 Stunden lang getrocknet und dann zusammen mit geeignetenTrockenmittel bei -20$^{o}$ C in lichtdichten Kästen aufbewahrt. Die Expositionszeit betrug durchschnittlich 8 Tage, dann wurden die Filme entwickelt, fixiert, gewässert und anschließend die Präparate mit Hämatoxylin angefärbt und mit Deckgläsern und Eukitt eingedeckt.

Zu Beginn der mikroskopischen Auswertung dieser Präparate wurde für jeden Meßpunkt aus der mittleren Anzahl der Markierungen pro

Zelle die Schwelle festgelegt, oberhalb derer eine Zelle als markiert registriert werden sollte. Diese untere Grenze lag durchschnittlich bei 10 Körnchen pro Zelle.
Es wurden dann pro Präparat 100 Mitosen registriert und der Anteil der markierten Mitosen (PLM) an deren Gesamtzahl ermittelt. Für die drei verschiedenen Tumoralter zeigt Abbildung 10 die sich aus diesen Untersuchungen ergebenden PLM-Kurven.
Die PLM-Kurve des 5 Tage alten Tumors zeigt bis zu einer Stunde nach Injektion keine markierten Mitosen, die ersten erscheinen in der Zeit zwischen 1 und 2 Stunden. Die Länge der G2-Phase beträgt also mindestens 1 Stunde. Es schließt sich ein Anstieg der markierten Mitosen an, der nach 7 Stunden ein Maximum erreicht; 9 Stunden nach Injektion folgt ein Abfall der Kurve, der zu einem scharfen Minimum führt ( 0% markierter Mitosen bei 12,5 Stunden nach Injektion ). Der dann folgende Anstieg ist wesentlicher flacher als der erste, der zweite Gipfel erreicht nur etwa die halbe Höhe des ersten.
Die entsprechenden Kurven für die beiden älteren Tumoren zeigen prinzipiell den gleichen Verlauf, doch sind die Gipfel niedriger, die Minima weniger ausgeprägt und die Steigungen geringer.
In die Fehler der einzelnen Meßpunkte gehen vor allem statistische Fehler bei der Suche nach markierten Mitosen ein, systematische Fehler durch falsches Identifizieren von Zellen als "Mitosen" oder als "markiert" sind quantitativ nicht erfaßbar. Die relativen statistischen Fehler berechnen sich aus:

$$\frac{\Delta PLM}{PLM} = \left( \frac{1}{\text{Zahl der markierten Mitosen}} \right)^{1/2}$$

der absolute Fehler beträgt also für PLM=10% etwa 3,3%, für PLM=50% etwa 7%.
Zur Auswertung dieser Kurven nach dem beschriebenen Verfahren ( Simpson-Herren 1968 ) wurden diese Kurven zunächst geglättet (Drei-Punkt-Glättung ). Die Fehler für die dann abgelesenen Werte

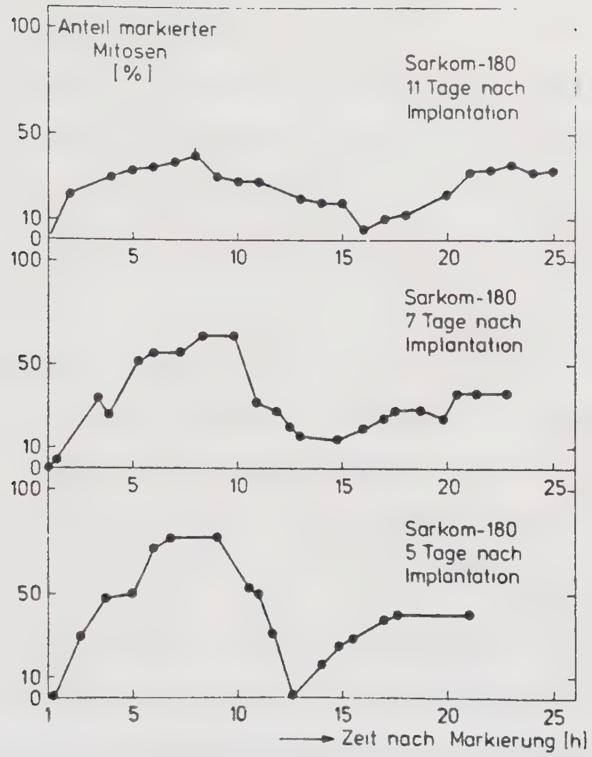



Abb. 10 Abhängigkeit des Anteils markierter Mitosen an der Gesamtzahl aller Mitosen ( =PLM ) von der Zeit zwischen Markierung und Entnahme der Zellen

| Tumoralter | 5 Tage | 7 Tage | 11 Tage |
|---|---|---|---|
| Volumen | 398±86 mm$^3$ | 1209±152 mm$^3$ | 2315±607 mm$^3$ |
| Zykluszeit $T_C$ | 14±1 h | 15±1,5 h | 17,5±1,5 h |
| $T_S$ | 8,5+0,5 h | 8±1 h | 10±1,5 h |
| $T_{G2+\frac{M}{2}}$ | 2±0,5 h | 3,5±0,5 h | 2±1 h |
| Markierungsindex | 34±2 % | 26±2 % | 17,5±1 % |
| Mitoseindex | 3,5±0,6 % | 3,1±0,6 % | 1,8±0,4 % |

Tab. 1 Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchung des Sarkoms-180 (NMRI-Maus )

für $T_S$, $T_{G2}$ und $T_C$ wurden aus den statistischen Fehlern abgeschätzt; sie enthalten keinerlei systematische Fehler, unterschätzen also die realen Fehler.

Die Werte für die sich aus Abbildung 10 ergebenden Längen der G2- und der S-Phase sowie die Länge des gesamten Zyklus $T_C$ sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Werte für $T_C$ deuten eine allmähliche Verlängerung der Zyklusdauer an, doch sind diese Verlängerungen in Anbetracht der experimentellen Fehler vernachlässigbar, sodaß die Zellzyklusdauer $T_C$ im folgenden als konstant angesehen werden kann. Sie beträgt, als Mittelwert der drei gemessenen Werte, $16 \pm 2$ Stunden.

Die Verteilungen der einzelnen Phasendauern auf die Tumorpopulation nehmen deutlich an Breite zu : der flacher werdende Anstieg der PLM-Kurven deutet auf eine wachsende Variation der Dauer der G1-Phase hin (Simpson-Herren 1968 ), der flacher werdende Abfall auf zunehmende Breite der $T_S$-Verteilung, das weniger ausgeprägte Minimum auf breiter werdende $T_C$-Verteilung.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Markierungs- und Mitoseindices geben die Anteile der markierten Zellen beziehungsweise der Mitosen an der Gesamtzahl der registrierten Zellen an; sie sind nach einer Stunde nach der Markierung des Tumors bestimmt. Dazu wurden je 1000 Zellen ausgezählt, die angegebenen Fehler berücksichtigen nur die hier eingehenden statistischen Fehler der Zählung.

Die erzielten Resultate für $T_C$ stimmen sehr gut überein mit Ergebnissen von Nishioka (1970 ), der das Sarkom-180 auf C3H-Mäusen untersuchte ; er fand eine konstante Dauer des Zellzyklus, die unabhängig von der Versorgungslage der untersuchten Zellen war. Größere Unterschiede finden sich beim Vergleich dieser Ergebnisse mit entsprechenden Messungen von Simpson-Herren ( 1970 ), die am Sarkom-180 auf Swiss-Mäusen eine Verdopplung der Zyklusdauer von 13 auf 26 Stunden feststellten.

IV.1.2. Messungen zur Tumorgeometrie

Die Bestimmung des Tumorvolumens V(t) aus dem (nicht-invasiv) gemessenen Tumordurchmesser d mit Hilfe der Gleichung (11) geht davon aus, daß der Tumor in guter Näherung als kugelförmig angesehen werden kann. Zur Untersuchung der Tumorgeometrie wurden im Verlaufe der durchgeführten Messungen jeweils einem Teil der Versuchstiere zu verschiedenen Stadien des Wachstums die Tumoren entnommen, nachdem zuvor das Volumen nach der zu überprüfenden Methode bestimmt worden war. Die Tumoren wurden gewogen und von dem Gewicht wurde das des gesunden Beins subtrahiert. Gleichzeitig wurden die Tumoren in drei zueinander senkrechten Ebenen mit einer Schublehre vermessen und das exakte Volumen durch Verdrängung von Wasser in einem Meßzylinder ermittelt. Auch hierbei wurde wieder das gesunde Bein berücksichtigt.

Als erstes Ergebnis wurde ein spezifisches Gewicht von $1 \pm 0,1 \text{ g cm}^{-3}$ ermittelt. Die Vermessung der Tumore und der Vergleich mit dem exakten Volumen zeigt, daß die Form eines Rotationsellipsoids die Geometrie der Tumoren besser beschreibt als die einer Kugel. Zwei der Durchmesser stimmen innerhalb ihrer experimentellen Fehler gut überein, der dritte ist um den konstanten Faktor 1,6 größer als die beiden anderen. Abbildung 11 zeigt das Tumorgewicht in Abhängigkeit von $d^3$; es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen. Eine rechnerische Geradenanpassung ergibt

$$V(t) = 0,825 \cdot d^3 - 0,075 \quad (\text{mm}^3) \qquad (12)$$

mit einem sehr hohen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,998$.

Die Konstanz des Verhältnisses der längeren Achse zu den beiden anderen bedeutet, daß das Tumorvolumen aus dem Volumen einer Kugel berechnet werden kann, deren Durchmesser gerade dieser kleineren Achse entspricht:

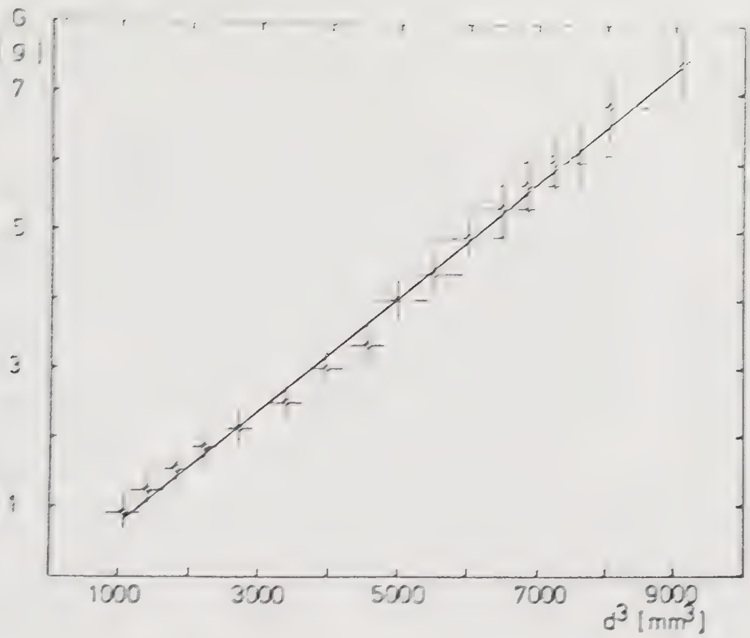



Abb. 11 Zusammenhang des Tumorgewichts mit der dritten Potenz des nicht-invasiv bestimmten Tumordurchmessers d

$$V_{Ellipse} = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3)$$

$d_1 = d_2$ $$= \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot (d_1^2 \cdot d_3)$$

$d_3 = 1,6 \cdot d_1$ $$= \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot 1,6 \cdot d_1^2 \cdot d_1$$

$$= 1,6 \cdot V_{Kugel} \qquad (\text{für } d_{Kugel} = d_1)$$

Wird nun das Tumorvolumen nach Gleichung (11) berechnet, so führt die Multiplikation mit dem genannten Faktor 1,6 zu der in Gleichung (12) genannten, experimentell nachgewiesenen Beziehung. Die so berechneten Volumina werden in Abbildung 12 mit dem Gewicht der Tumoren verglichen. Der Quotient aus Tumorgewicht und Volumen G/V, das spezifische Gewicht, schwankt innerhalb der experimentellen Fehler um den Wert 1. Die Meß-

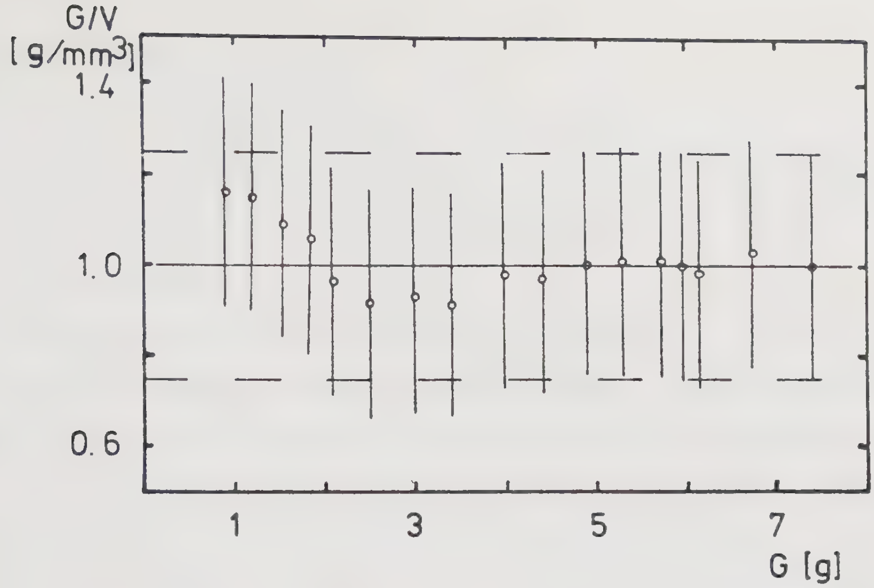



Abb. 12 Abhängigkeit des spezifischen Gewichts G/V vom Tumorgewicht G bei nicht-invasiver Bestimmung des Volumens V

werte liegen innerhalb eines Streifens von 25% Breite, die sich als mittlerer Meßfehler des spezifischen Gewichts berechnen lassen ( $\frac{\Delta V}{V} = 16\%$, $\frac{\Delta G}{G} = 10\%$ ).

Die Verwendung von Gleichung (12) erlaubt es also demnach, das Volumen eines Tumors aus dem nicht-invasiv meßbaren äußeren Durchmesser des Tumors zu bestimmen. Gleichzeitig ist gezeigt, daß Gleichung (11) ein direktes Maß für das Tumorvolumen liefert ( Porschen 1969 ).

## IV.2. Nicht-invasive Messungen

### IV.2.1. Volumenmessungen

Die Resultate der invasiven Messungen des Tumorgewichts und des Tumorvolumens haben gezeigt, daß sich aus dem nicht-invasiv gemessenen Tumordurchmesser ein direktes Maß für die Tumorgröße ermitteln läßt.

Dieses Tumorvolumen V(t) wurde im Verlaufe aller Experimente kontinuierlich verfolgt, die im Rahmen dieser Untersuchung angestellt wurden. Bei allen Meßserien wurde das Tumorvolumen vom 4.-5. Tag nach Implantation an täglich gemessen. Da vermutlich Tiere mit überdurchschnittlich großen Tumoren früher sterben als solche mit kleinen Tumoren und so durch Absterben von Versuchstieren die Volumenmessungen verfälschte Werte liefern würden, wurden diese Messungen dann abgebrochen, wenn etwa 10% der Versuchstiere gestorben waren. Weitere Kontrollmessungen wurden jedoch durchgeführt, um im Nachhinein Tiere bei der Auswertung ausschließen zu können, die erkennbare Tumorregression zeigten.

Abbildung 13 zeigt im halblogarithmischen Maßstab eine typische Wachstumskurve. Sie wurde an 140 Tieren gemessen, von denen in 2-tägigem Abstand je 10 getötet wurden, um Tumorgewicht und -volumen mit dem nicht-invasiv gemessenen vergleichen zu können.

Man erkennt, daß die Kurve kein exponentielles Wachstum beschreibt, die relative Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)/V(t)$ nimmt deutlich mit dem Tumoralter ab. Die Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)$ wurde aus V(t) durch graphische Differentiation gewonnen (Bronstein 1973), sie hat nach anfänglichem Anstieg ein Maximum am 12. Tag und fällt danach wieder ab.

Ebenfalls aus der Volumenkurve zu entnehmen ist die Volumenverdopplungszeit $T_d$, die von 36 Stunden am 5. Tag auf 250 Stunden am 18. Tag anwächst.

Die der Abbildung 13 zugrunde liegenden Wachstumsdaten sind

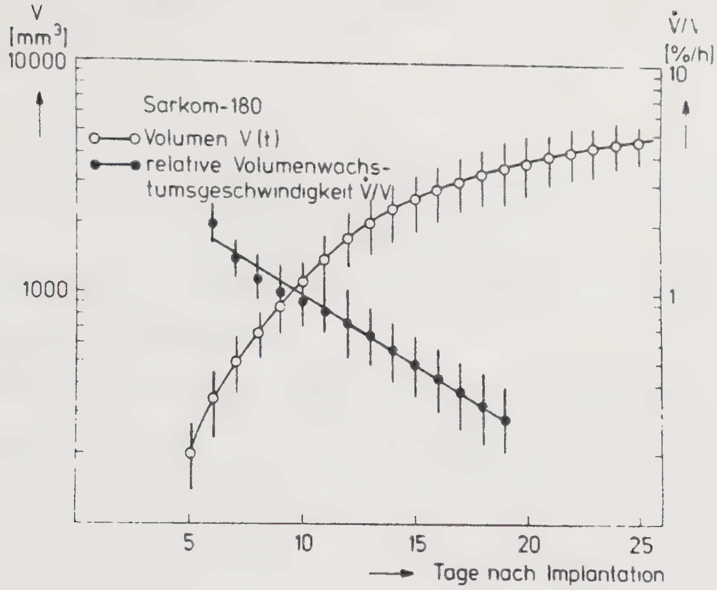



Abb. 13 Tumorvolumen und relative Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Tumoralter

| Tumoralter [d] | Tumorvol. [$mm^3$] | $\dot{V}(t)$ [$mm^3 d^{-1}$] | $\dot{V}/V(t)$ [$\% h^{-1}$] | $T_d$ [h] |
|---|---|---|---|---|
| 5 | 196 | 159 | 1,93 | 36 |
| 6 | 358 | 165 | 1,30 | 50 |
| 7 | 429 | 177 | 1,12 | 62 |
| 8 | 729 | 204 | 0,99 | 70 |
| 9 | 860 | 238 | 0,90 | 77 |
| 10 | 1100 | 268 | 0,82 | 85 |
| 11 | 1375 | 298 | 0,73 | 95 |
| 12 | 1842 | 314 | 0,65 | 106 |
| 13 | 1923 | 306 | 0,56 | 125 |
| 14 | 2276 | 297 | 0,49 | 143 |
| 15 | 2586 | 282 | 0,42 | 165 |
| 16 | 2800 | 267 | 0,37 | 190 |
| 17 | 3050 | 249 | 0,32 | 220 |
| 18 | 3290 | 233 | 0,28 | 250 |
| 19 | 3500 | - | - | - |
| 20 | 3700 | - | - | - |
| 21 | 3976 | - | - | - |
| 22 | 4100 | - | - | - |
| 23 | 4300 | - | - | - |
| 24 | 4500 | - | - | - |
| 25 | 4622 | - | - | - |

Tab. 2 Wachstumsdaten des Sarkoms-180

sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Vergleichbare Resultate wurden bei allen im Rahmen dieser Untersuchung verfolgten Wachstumskurven gefunden.

IV.2.2. IUdR-Technik : Messung von Proliferationsaktivität und Aktivitätsverlustraten

Die beschriebene IUdR-Technik erfordert die Durchführung von zwei vorbereitenden Meßreihen:

- zur Bestimmung von Korrekturfaktoren, mit deren Hilfe sich die Absorption der von Jod-125 emittierten Photonen im Tumor und die unterschiedliche Meßgeometrie bei verschieden großen Tumoren berücksichtigen läßt
- zur Ermittlung des Ansprechvermögens der Meßapparatur, deren Kenntnis die Berechnung der im Tumor vorhandenen absoluten Aktivitätsmenge erlaubt.

Korrekturfaktoren

Zur Berücksichtigung der sich mit wachsendem Tumor ändernden Meßgeometrie und der Absorption im Tumor wurden dünnwandige, kugelförmige Glaskölbchen mit Durchmessern von 7 bis 22 mm mit je 0,1 µCi J-125-IUdR-Lösung gefüllt und das restliche Volumen mit Wasser aufgefüllt. Die Absorption der Photonen im Wasser ist nahezu dieselbe wie im Gewebe. Die Aktivität in den Kölbchen wurde am Tumormeßplatz mehrfach unter den gleichen geometrischen Verhältnissen ausgemessen wie die von vergleichbar großen Tumoren. Zuvor waren die Kölbchen in einem Bohrloch-Szintillationszähler ausgemessen worden, um Fehler beim Einfüllen der radioaktiven Lösung ausgleichen zu können.

Die Abhängigkeit der Zählraten vom Durchmesser ist, halblogarithmisch aufgetragen, in guter Näherung linear; an die Meßpunkte wurde rechnerisch die beste Gerade angepaßt und es ergaben sich die in Abbildung 14 aufgetragenen Korrekturfaktoren, mit denen die am Tumormeßplatz ermittelten Zählraten multipliziert werden müssen, um Verfälschungen bei der Messung unterschiedlich großer

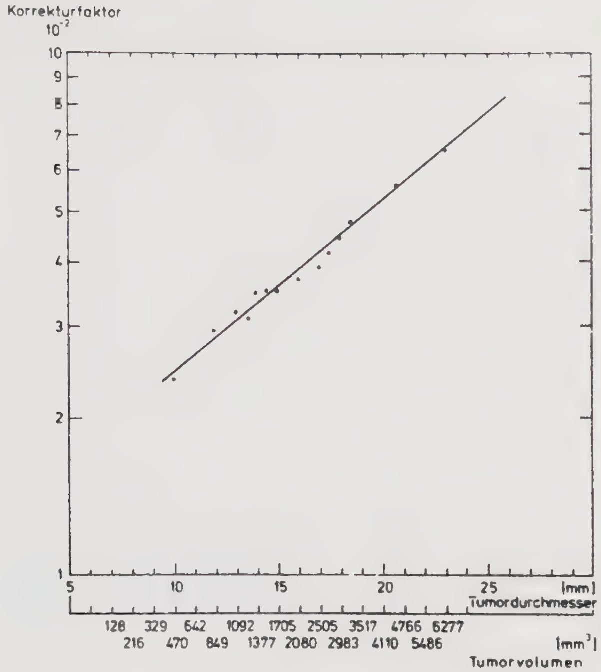



Abb. 14 Faktoren zur Geometriekorrektur in Abhängigkeit vom Tumordurchmesser und -volumen

Tumore zu vermeiden. In Tabelle 3 sind diese Ergebnisse noch einmal aufgeführt, wobei die Korrekturfaktoren zur besseren Vergleichbarkeit mit früheren Messungen ( Gewehr 1977 ) auf den Wert des 10 mm dicken Kölbchens normiert wurden.

Ansprechvermögen des Detektors

Die Ausbeute des Tumormeßplatzes, also die Wahrscheinlichkeit, mit der ein einzelnes Photon aus dem Tumor im Detektor nachgewiesen wird, wurde mit Hilfe eines Eichstandards ermittelt. Dazu wurde eine J-125-IUdR-Lösung mit genau bekannter Aktivität in das Glaskölbchen injiziert, auf das die zuvor berechneten Korrekturfaktoren normiert worden waren ( d = 10 mm ). Die Messung der Aktivität in diesem Kölbchen ergab für den Tumormeßplatz

| Tumor-durchmesser [mm] | Tumor-volumen [mm³] | Korrektur-faktor | Tumor-durchmesser [mm] | Tumor-volumen [mm³] | Korrektur-faktor |
|---|---|---|---|---|---|
| 7,0 | 128 | 0,80 | 17,0 | 2505 | 1,71 |
| 7,5 | 169 | 0,83 | 17,5 | 2737 | 1,77 |
| 8,0 | 216 | 0,86 | 18,0 | 2983 | 1,84 |
| 8,5 | 269 | 0,89 | 18,5 | 3242 | 1,91 |
| 9,0 | 329 | 0,93 | 19,0 | 3517 | 1,98 |
| 9,5 | 395 | 0,96 | 19,5 | 3806 | 2,06 |
| 10,0 | 470 | 1,00 | 20,0 | 4110 | 2,14 |
| 10,5 | 552 | 1,04 | 20,5 | 4430 | 2,23 |
| 11,0 | 642 | 1,08 | 21,0 | 4766 | 2,31 |
| 11,5 | 741 | 1,12 | 21,5 | 5118 | 2,39 |
| 12,0 | 849 | 1,16 | 22,0 | 5486 | 2,49 |
| 12,5 | 966 | 1,21 | 22,5 | 5873 | 2,58 |
| 13,0 | 1092 | 1,26 | 23,0 | 6277 | 2,69 |
| 13,5 | 1229 | 1,31 | 23,5 | 6699 | 2,78 |
| 14,0 | 1377 | 1,36 | 24,0 | 7319 | 2,90 |
| 14,5 | 1535 | 1,41 | | | |
| 15,0 | 1705 | 1,47 | | | |
| 15,5 | 1886 | 1,51 | | | |
| 16,0 | 2080 | 1,58 | | | |
| 16,5 | 2286 | 1,63 | | | |

Tab. 3 Normierte Faktoren zur Geometriekorrektur

ein Ansprechvermögen von 15 ± 1 Prozent.

IV. 2. 2. a) Einbauratenmessung

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität eines Tumors in Abhängigkeit von seinem Alter wurde eine Versuchsserie an 200 Tieren durchgeführt. Außerdem steht eine Meßreihe zur Verfügung, die sich aus Aktivitätsverlustmessungen vorangegangener Untersuchungen gewinnen läßt ( Sommer 1977 ).
Bei der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Meßserie wurden, beginnend mit dem 5. Tag nach der Implantation des Tumors, je 20 Tieren in 1- bis 2-tägigem Abstand je 10 µCi J-125-IUdR in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert und die im Tumor und im gesunden Bein gebundene Aktivität 48 und 72 Stunden nach der Injektion gemessen.

Nach Subtraktion des Untergrunds und der Zählrate des gesunden Beins wurden die am Tumormeßplatz gewonnenen Zählraten mit den zuvor ermittelten Faktoren bezüglich der unterschiedlichen Meßgeometrien korrigiert und auf gleiche applizierte Aktivitätsmenge normiert. Für diese Normierung waren alle Tiere sofort nach der Injektion in einem Ganzkörperzähler für Kleintiere ausgemessen worden. Die Ansprechwahrscheinlichkeit dieses Detektors wurde mit Hilfe eines Eichstandards zu $3,9 \pm 0,2$ % ermittelt, wobei hier die Absorption der Strahlung in der Maus berücksichtigt werden mußte; diese wurde zu 22% bestimmt.

Während des gesamten Verlaufs des Experimentes wurde das Volumen von jeweils 40 willkürlich herausgesuchten Tumoren täglich bestimmt; in 2-3 tägigem Abstand wurden alle Tumore vermessen.

Aus den korrigierten Zählraten wurde mit Hilfe des bekannten Ansprechvermögens des Tumormeßplatzes die im Tumor gebundene absolute Aktivität berechnet. Zur Berechnung des Anteils der eingebauten Aktivität an der gesamten injizierten Menge wurde die spezifische Aktivität der kommerziell erhaltenen Lösung untersucht, sie betrug 667 µCi/ml. Die Aktivität dieser Lösung liegt nicht nur in Form radioaktiv markierten IUdR's vor; es befinden sich ebenfalls elementares Jod und Jod-Uracil in der Lösung. Der Anteil des in die Zell-DNA einbaubaren IUdR wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bestimmt; er betrug ca. 60%.

Anhand dieser Ergebnisse konnte dann der Anteil E(t) bestimmt werden, der von einer bestimmten Injektionsdosis IUdR in die Zellen der Tumoren in den verschiedenen Wachstumsstadien eingebaut worden war. Die auf diesem Wege ermittelten Einbauraten E(t) sind zusammen mit den entsprechenden Wachstumsdaten in Tabelle 4 aufgeführt. Die Einbauraten sind in Abhängigkeit vom Tumoralter in Abbildung 15 aufgetragen.

Die Fehler der in Tabelle 4 aufgelisteten Werte betragen für $\dot{V}(t)$ im Mittel $1\ mm^3 h^{-1}$, für $\dot{V}(t)/V(t)$ maximal $0,3\ \%h^{-1}$ am 5. Tag und minimal $0,03\%h^{-1}$ am 17. Tag, für $E(t)/V(t)$ 0,2 bis

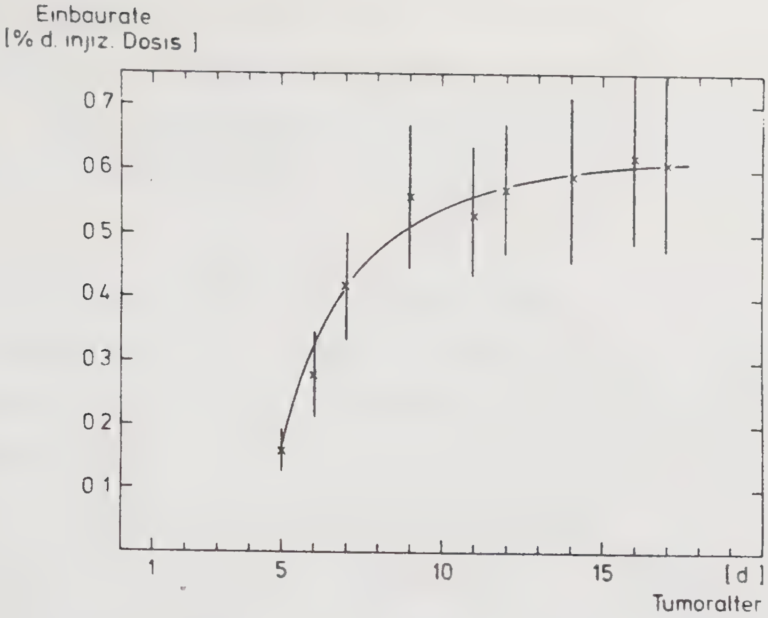



Abb. 15 Abhängigkeit der in die untersuchten Tumoren eingebauten Aktivität vom Tumoralter

| Tumoralter [d] | V(t) [mm³] | $\dot{V}$(t) [mm³h⁻¹] | $\dot{V}$/V(t) [%·h⁻¹] | E(t) [%d.inj.Dos] | E/V(t) ×10⁻⁴ |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 360 | 5,83 | 1,6 | 0,16 | 6,3 |
| 6 | 500 | 6,67 | 1,3 | 0,28 | 5,7 |
| 7 | 680 | 7,5 | 1,1 | 0,42 | 5,5 |
| 8 | 840 | 7,9 | 0,9 | – | – |
| 9 | 1040 | – | – | 0,56 | 4,4 |
| 10 | 1260 | 10 | 0,79 | – | – |
| 11 | 1560 | 13 | 0,85 | 0,53 | 3,7 |
| 12 | 1920 | 15 | 0,78 | 0,57 | 3,1 |
| 13 | 2300 | – | – | – | – |
| 14 | 2700 | 16 | 0,59 | 0,59 | 2,1 |
| 15 | 3080 | 16 | 0,52 | – | – |
| 16 | 3460 | – | 0,46 | 0,62 | 1,8 |
| 17 | 3880 | – | 0,41 | 0,61 | 1,8 |

Tab. 4 Wachstumsdaten und Aktivitätseinbauraten E des Sarkoms-180 (zur Berechnung von E/V wurde das Volumen der betreffenden Tiergruppe verwendet)

0,6 %der inj. Dosis $mm^{-3}$.

Der Vergleich dieser Resultate mit anderen Einbauratenmessungen ( Sommer 1977 )zeigt qualitativ die gleichen Abhängigkeiten der Proliferationsaktivität vom Tumoralter wie die hier gefundenen.

IV.2.2.b) Messung von Aktivitätsverlusten

Zur Ermittlung der mit Hilfe der IUdR-Technik meßbaren Aktivitätsverluste stehen mehrere Meßreihen zur Verfügung, da bei der Anwendung dieser Methode auf die Untersuchung von Therapiewirkungen in jedem Fall die Aktivitätsverluste einer unbehandelten Kontrollgruppe mitverfolgt werden. Die aus solchen Messungen hervorgegangenen Ergebnisse wurden von Mühlensiepen zusammengestellt ( Mühlensiepen 1976 ).

Eine Bestimmung der Verlustraten bei einer einheitlichen Transplantationsserie wurde im Rahmen einer Ingenieurarbeit ( Sommer 1977 ) durchgeführt. Bei dieser Versuchsserie wurde bei 9 verschiedenen Wachstumsstadien der untersuchten Tumore J-125-IUdR injiziert und die im Tumor eingebaute Aktivität anschließend täglich am Tumormeßplatz bestimmt. Die dort ermittelten Zählraten wurden auf gleiche injizierte Aktivitäten normiert, der physikalische Jod-Zerfall korrigiert und entsprechende Geometrie- und Absorptionskorrekturen angebracht.

Abbildung 17 zeigt die Resultate dieser Meßserien und die genannte Zusammenstellung vorangegangener Messungen. In die eingezeichneten Meßfehler gehen statistische Fehler (5-10%), Fehler der Korrekturen (10%) und Fehler bei der Ermittlung der Aktivitätsverluste (10%) ein. Die Meßwerte zeigen einen leichten Anstieg der Verluste mit dem Tumoralter bzw. dem Tumorvolumen, doch sind diese Unterschiede in Anbetracht der Meßfehler nicht signifikant. Die Aktivitätsverlustrate kann als unabhängig von dem Tumoralter angesehen werden. Der Mittelwert der von Mühlensiepen zusammengestellten Ergebnisse führt zu einer Verlustrate der im Tumor eingebauten Aktivität von $0,5 \pm 0,1$ % $h^{-1}$, die Ergebnisse von Sommer zu $0,4 \pm 0,1$ %$h^{-1}$.

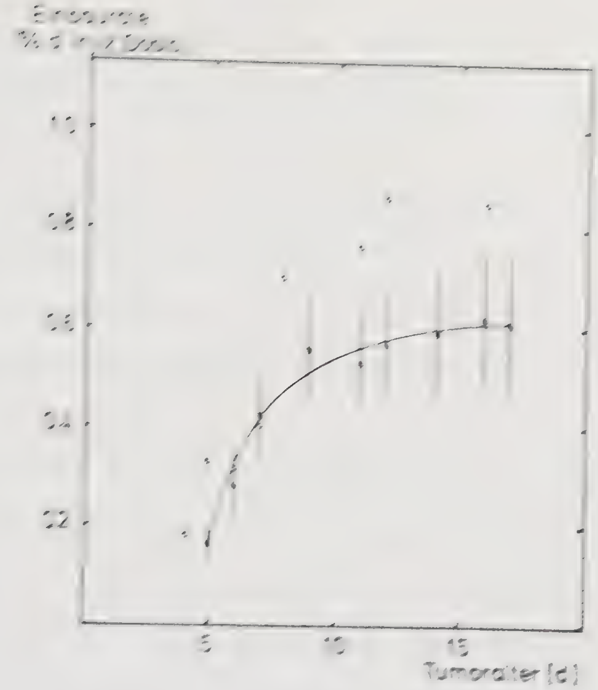



Abb. 16 Vergleich zweier Einbauratenmessungen

• Werte d. Tab. 4

+Werte aus: Sommer 1977

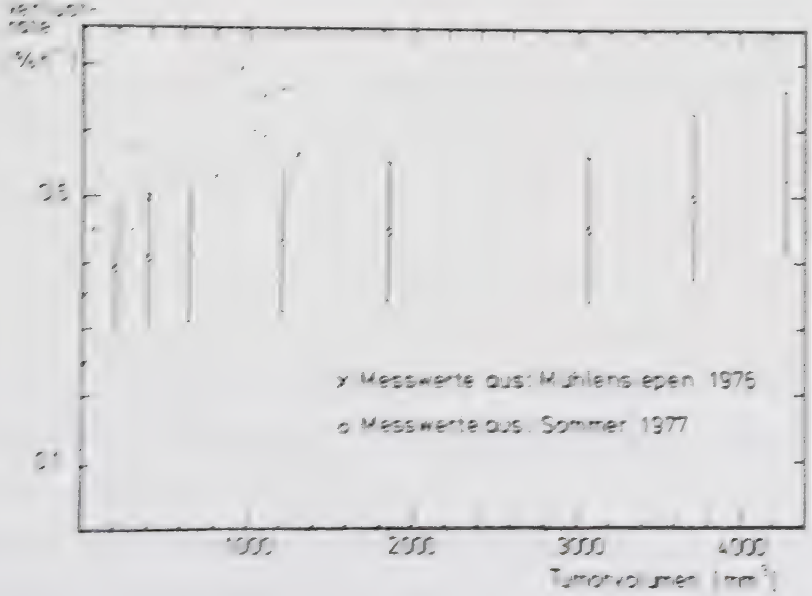



Abb. 17 Zusammenstellung verschiedener Verlustratenmessungen in Abhängigkeit vom Tumorvolumen

## IV. 3. Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der beschriebenen Messungen liefern zahlreiche Informationen über die das Tumorwachstum bestimmenden Parameter.

Nachdem die vorbereitenden Messungen zur Tumorgeometrie gezeigt haben, daß das Tumorvolumen nicht-invasiv aus dem in-vivo meßbaren Tumordurchmesser bestimmt werden kann, war es möglich, das Wachstum des Sarkom-180 ohne Störung der Tumor-Wirt-Beziehungen zu verfolgen.

Es ergaben sich so Wachstumskurven V(t), die die vereinfachende Annahme eines exponentiellen Wachstums ausschließen. Da die zeitliche Konstanz der tumorkinetischen Parameter gleichbedeutend mit exponentiellem Wachstum ist, bedeutet dieses erste Ergebnis, daß zur Erklärung dieser gegenüber dem exponentiellen Verlauf retardierten Tumorentwicklung mindestens einer der Kinetikparameter als zeitlich variabel angesehen werden muß.

Aus der gemessenen Abhängigkeit des Tumorvolumens vom Tumoralter konnte die relative Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)/V(t)$ berechnet werden (Abbildung 13, Tabelle 3, Tabelle 4). Es zeigt sich, daß diese Größe mit wachsendem Tumor abnimmt. Dieser Abfall kann in sehr guter Näherung durch eine einfache Exponentialfunktion beschrieben werden. Für die Meßergebnisse der Tabelle 4 lautet dieser Zusammenhang:

$$\frac{\dot{V}(t)}{V(t)} = 0{,}024 \cdot \exp(-0{,}0043 \cdot t) \qquad (t \text{ in h}) \qquad (13)$$

Diese Funktion wurde rechnerisch an die Meßpunkte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepaßt; diese lieferte einen Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0{,}97$.

Die gefundene Wachstumsretardierung kann nur auf sich mit der Zeit ändernde tumorkinetische Parameter zurückgeführt werden. Sie könnte erklärt werden durch eine sich verlangsamende Zellproduktion, also durch eine länger werdende Zellzyklusdauer $T_C$,

durch eine Abnahme des Anteils proliferierender Zellen am Gesamttumor, also der Wachstumsfraktion, und durch steigende Zellverluste.

Die autoradiographisch durchgeführte Bestimmung der Zellzykluszeit in Abhängigkeit vom Tumoralter schließt die zuerst genannte Erklärungsmöglichkeit aus : innerhalb der experimentellen Fehler kann $T_C$ als konstant angesehen werden.

$$T_C = 16 \pm 2 \text{ Stunden}$$

Damit ist ebenso die Zellproduktionsrate $k_P$ der proliferierenden Zellen unabhängig vom Tumoralter ( Gleichung (4) in II. 1 ) :

$$k_P = 4,3 \pm 0,6 \ \% \ h^{-1} \qquad (14)$$

Die Erklärung für die Wachstumsretardierung liefert die Messung des IUdR-Einbaus in den Tumor in Abhängigkeit vom Tumoralter. Wie Tabelle 4 zeigt, nimmt der Einbau $E(t)/V(t)$ pro Tumorvolumen rasch mit wachsendem Tumor ab. In Abbildung 18 wird diese Zeitabhängigkeit mit der der relativen Wachstumsrate $\dot{V}(t)/V(t)$ verglichen. In dieser halblogarithmischen Darstellung ergeben beide

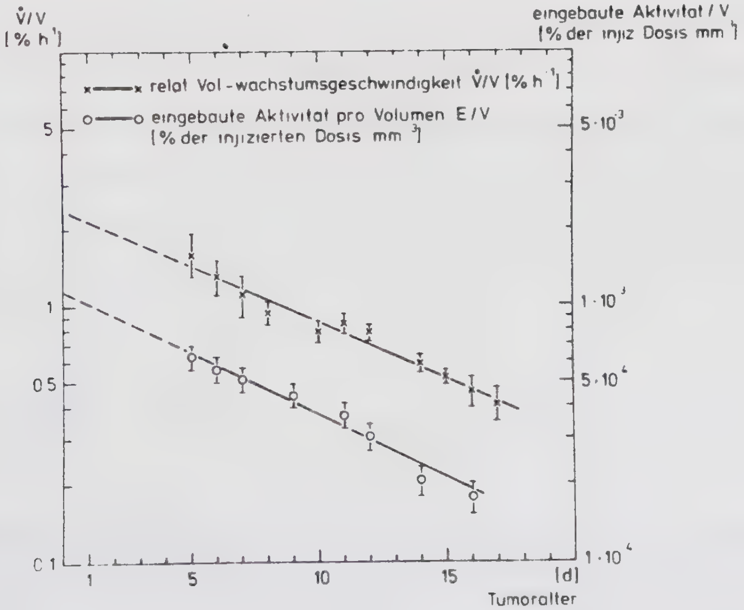



Abb. 18 Relat. Wachstumsgeschwindigkeit und IUdR-Einbau pro Volumen in Abhängigkeit vom Tumoralter

Meßreihen in sehr guter Näherung Geraden, die Werte nehmen also exponentiell mit der Zeit ab.
Von besonderer Bedeutung ist hier, daß die beiden Geraden nahezu parallel verlaufen. Dies wird deutlicher durch die Anpassung einer Exponentialfunktion an die Meßwerte E(t)/V(t) :

$$\frac{E(t)}{V(t)} = 0{,}00115 \cdot \exp(-0{,}0047 \cdot t) \quad (t \text{ in h}) \qquad (15)$$

( E(t) wird hier in Prozent der injizierten Dosis angegeben).
Der Vergleich der Gleichungen (13) und (14) zeigt, daß die Steigungen der beiden Geraden nahezu exakt übereinstimmen (die Abweichung liegt bei 8%). Aus dieser guten Übereinstimmung ergibt sich, daß die Abnahme der Proliferationsaktivität pro Tumorvolumen, wie sie durch E(t)/V(t) gemessen wird, die zeitliche Abnahme der relativen Wachstumsgeschwindigkeit und damit das nicht-exponentielle Wachstum vollständig erklären kann.
Die Proliferationsaktivität eines Tumors hängt von zwei Parametern ab, von der Proliferationsgeschwindigkeit und dem Anteil der an der Proliferation beteiligten Zellen, also der Wachstumsfraktion.
Da sich die Zellzykluszeit, und damit die Proliferationsgeschwindigkeit, experimentell als konstant erwiesen hat, ist die nachgewiesene Abnahme der Proliferationsaktivität auf eine Abnahme von GF zurückzuführen. Die nicht-invasiv gemessene Größe E(t)/V(t) spiegelt demnach den zeitlichen Verlauf der Wachstumsfraktion wider; aus der Proportionalität von E(t)/V(t) und der Proliferationstätigkeit und aus der Konstanz von $k_p$ ergibt sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen E(t)/V(t) und GF(t) :

$$\frac{E(t)}{V(t)} = c \cdot GF(t) \qquad (16)$$

c ist eine Proportionalitätskonstante, die vor allem von dem Anteil der Tumorzellen in der DNA-Synthesephase und von der pro proliferierender P-Zelle eingebauten IUdR-Menge abhängt. Sie kann

auf verschiedenen Wegen abgeschätzt werden, um GF(t) zu berechnen. Der einfachste Weg geht von der Annahme aus, daß zu Beginn des Tumorwachstums, also zur Zeit t=0, keine Q-Zellen oder Nekrose vorliegen, daß also

$$GF(t = 0) = 1 \qquad (17)$$

gilt. Diese Annahme führt zu den GF(t)-Werten der Tabelle 5.

| Tumoralter (d) | Tumorvolumen ($mm^{-3}$) | GF (%) |
|---|---|---|
| 5 | 360 | 57 |
| 6 | 500 | 51 |
| 7 | 680 | 45 |
| 8 | 840 | 41 |
| 9 | 1040 | 36 |
| 10 | 1260 | 32 |
| 11 | 1560 | 29 |
| 12 | 1920 | 26 |
| 13 | 2300 | 23 |
| 14 | 2700 | 21 |
| 15 | 3080 | 18 |
| 16 | 3460 | 17 |
| 17 | 3880 | 15 |

Tab. 5 Abhängigkeit der Wachstumsfraktion GF von Tumoralter und -volumen bei ungestörtem Wachstum

Diese Werte beruhen auf den Wachstumsdaten der Tabelle 4; sie gelten ausschließlich für das Wachstum ungestörter, das heißt unbehandelter Tumore.

Tumore verschiedener Transplantationsserien können sehr unterschiedliche Wachstumskurven aufweisen, die zwar zu stark voneinander abweichenden Volumina und Wachstumsraten führen, die aber alle den hier

gezeigten exponentiellen Abfall der relativen Wachstumsrate aufweisen ( Tabelle 2 ,Sommer 1977 ). Auch die zweite zur Verfügung stehende Messung der IUdR-Einbaurate, die aus den Verlustratenmessungen ( Sommer 1977 ) gewonnen werden kann, zeigt, daß die Wachstumsretardierung vollständig auf eine Abnahme der Proliferationstätigkeit zurückgeführt werden kann.

Wird die Retardierung des Tumorwachstums ganz auf die zeitliche Abnahme der Proliferationsaktivität zurückgeführt, so muß sich das Tumorvolumen aus der Einbaurate E(t) berechnen lassen. Dies zeigt Abbildung 19, in der das Zeitintegral von E(t) mit dem Tumorvolumen V(t) ( Tabelle 4 ) verglichen wird. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen; es ist demnach möglich aus der nicht-invasiv meßbaren IUdR-Einbaurate ein relatives Maß für das Tumorvolumen zu finden, die Kenntnis zweier Volumina reicht aus, um das exakte Tumorvolumen zu jedem anderen Zeitpunkt der Tumorentwicklung zu berechnen.

Die hier gefundene lineare Korrelation zwischen dem Zeitintegral von E(t) und dem Tumorvolumen macht jedoch gleichzeitig den Einfluß der experimentellen Fehler deutlich, die in diese Rechnung eingehen. Die Gerade, die innerhalb der Meßfehler durch die Punkte der Abbildung 19 gelegt werden kann, legt einen proportionalen Zu-

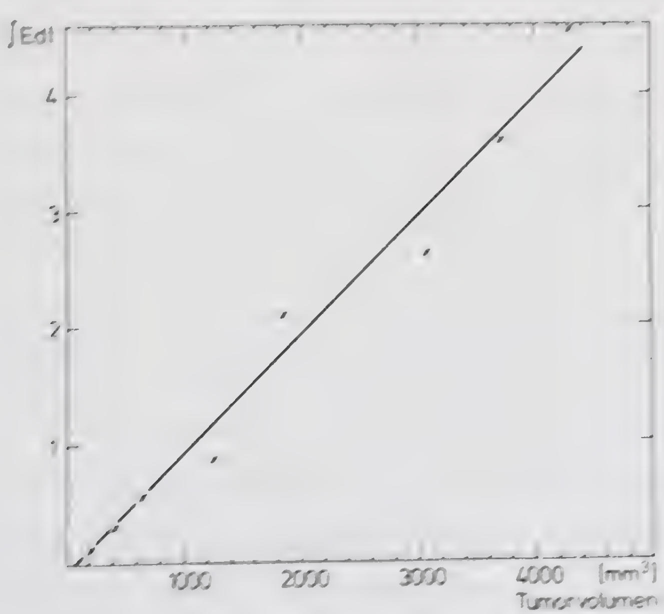



Abb. 19 Vergleich des Zeitintegrals von E(t) mit dem gemessenen Tumorvolumen V(t)

sammenhang zwischen $E(t)/V(t)$ und $\dot{V}(t)/V(t)$ nahe und damit eine Proportionalität zwischen $E(t)$ und $V(t)$. Dies aber würde der Differentialgleichung (10) ( in II. 3. ) widersprechen, derzufolge ein linearer Term benötigt wird, um Zellverluste berücksichtigen zu können. Durch die zur Berechnung von GF(t) benötigte Normierung von $E(t)$ (vergleiche Gleichung (16), $c = 0{,}00115$ ) wird dieser additive Term jedoch so klein, daß er in Hinblick auf die hier eingehenden Fehler keine Rolle mehr spielt. Dies bedeutet allerdings auch, daß aus der Berechnung von GF(t) aus $E(t)/V(t)$ keine Rückschlüsse auf Zellverlustraten gezogen werden können. Die über die Tumorzellen gemittelte Zellverlustrate L kann nicht aus $\dot{V}(t)/V(t)$ und $E(t)/V(t)$ berechnet werden; dies zeigt sich auch bei dem Versuch, an die Wertepaare $\dot{V}(t)/V(t)$ und $E(t)/V(t)$ eine Gerade anzupassen:

$$\frac{\dot{V}(t)}{V(t)} = 0{,}00188 \frac{E(t)}{V(t)} + 0{,}00144 \qquad (18)$$

(Korrelationskoeffizient $r^2 = 0{,}97$ ). Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen ist zwar in sehr guter Näherung linear und der Betrag der Steigung bestätigt noch einmal die in den Gleichungen (13) und (15) auftretenden Faktoren, doch würde der Vergleich dieser Gleichung mit Gleichung (10) einen negativen Verlust ergeben. Es ist also unmöglich, L aus den hier genannten Ergebnissen zu bestimmen, die experimentellen Fehler würden zu nicht sinnvollen Resultaten führen. Eine Abschätzung der Zellverlustrate kann demnach nur bei Verwendung entsprechender tumorkinetischer Modelle erfolgen. Die Möglichkeit, die Wachstumsretardierung des Tumors innerhalb der experimentellen Fehler vollständig auf einen Rückgang der Wachstumsfraktion zurückzuführen, erlaubt allerdings den Schluß, daß entweder Zellverluste beim Sarkom-180 eine unbedeutende Rolle spielen oder daß die mittlere Verlustrate L näherungsweise als zeitlich konstant, als unabhängig vom Tumor-

alter angesehen werden muß. Diese Deutung wird durch die Ergebnisse der Aktivitätsverlustratenmessung unterstützt, die ja zeitunabhängige Verlustraten ergaben. Die Übertragung dieser Aktivitätsverlustraten auf Zellverluste setzt allerdings voraus, daß der bei diesen Messungen miterfaßte Anteil von IUdR-Aktivität in der Nekrose vernachlässigbar klein ist. Hierüber ist durch nichtinvasive Messungen keine Aussage möglich.
Einen Anhaltspunkt zur Übertragbarkeit der Aktivitätsverluste auf Zellverluste gibt der Versuch, aus der bekannten Wachstumsfraktion GF, der gemessenen Wachstumsgeschwindigkeit und eben aus der Aktivitätsverlustrate bei Verwendung einiger Vereinfachungen die Zykluszeit $T_C$ abzuschätzen und dieses Ergebnis mit dem Resultat der (invasiven) autoradiographischen Methode zu vergleichen. Zu diesem Zweck wird die Differentialgleichung (10) (in II. 3) für einen kleinen Tumor ausgewertet, das heißt, für einen Tumor, dessen Anteile an Q-Zellen und Nekrose als vernachlässigbar klein angesehen werden sollen. Diese Beschränkung auf kleine Tumore bedeutet keine Einschränkung der Anwendbarkeit der beschriebenen Abschätzung, da $T_C$ unabhängig vom Tumoralter ist. Für kleine Tumore gilt nun:

$$\dot{V}(t) = k_P \cdot V_P(t) - L(t) \cdot V_P(t) = ( k_P - L(t) ) \cdot GF(t) \cdot V(t)$$

Wird nun in dieser Gleichung die Wachstumsfraktion durch die entsprechend normierte Einbaurate pro Tumorvolumen ersetzt, so erhält man:

$$\dot{V}(t) = ( k_P - L(t) ) \cdot E_{norm.}(t)$$

Die experimentellen Ergebnisse der Tabelle 4 ergeben für V(t) und E(t) den linearen Zusammenhang:

$$\dot{V}(t) = 23,2 \cdot E(t) - 0,46$$

Die Vernachlässigung des additiven Terms führt zu einem zusätzlichen Fehler von V(t), der, in Abhängigkeit von E(t), minimal 2%, maximal 16% und im Mittel 4% beträgt.

Wird nun der gleiche Normierungsfaktor c verwendet, der der Berechnung der Wachstumsfraktionen der Tabelle 5 zugrunde liegt und der unter der Annahme von

$$GF(t=0) = 1$$

berechnet wurde, so erhält man durch den Vergleich dieser beiden Gleichungen für $\dot{V}$:

$$23{,}2\ E(t) = \frac{(k_P - L(t))\ E(t)}{0{,}00115}$$

und es ergibt sich so die Beziehung:

$$(k_P - L(t)) = 0{,}027\ h^{-1}$$

Verwendet man nun für die Zellverlustrate L(t) die nicht-invasiv gemessene Aktivitätsverlustrate $L_{akt.}$ von $0{,}5 \pm 0{,}1\ \%\ h^{-1}$, so ergibt sich:

$$k_P = 0{,}032\ h^{-1}$$

und unter der Verwendung von Gleichung (2) ( in II.2 ) wird die Zellzykluszeit $T_C$ zu

$$T_C = 21\ h$$

abgeschätzt.

Die Übereinstimmung der so abgeschätzten Zellzykluszeit und der autoradiographisch ermittelten sowie der daraus berechneten Zellproduktionsraten ist in Anbetracht der zahlreich eingehenden Meßfehler und vereinfachenden Annahmen gut. Sie bestätigt so die

Anwendbarkeit sowohl der verwandten Näherungen als auch der ausschließlich nicht-invasiven Meßmethoden, auf denen die durchgeführten Untersuchungen beruhen.

# V. MODELLE DER TUMORKINETIK UND IHRE ANWENDUNG AUF DAS SARKOM-180

Tumormodelle dienen der vereinfachenden Beschreibung des komplexen Geschehens in Tumoren. Sie gehen von experimentellen Erkenntnissen aus und verwenden Vereinfachungen, die durch empirische Ergebnisse nahegelegt werden und die weitergehende Aussagen erlauben.

Im folgenden sollen zwei sehr häufig verwendete Tumormodelle beschrieben werden, die von Steel ( 1967 ) und von Mendelsohn ( 1960 ) enwickelt wurden. Außerdem wird die Beschreibung von Tumorwachstumskurven durch Gompertz-Funktionen skizziert, die systematische Vergleiche verschiedener Tumor-Wirt-Systeme erlauben.

## V.1. Steel-Modell

Dieses Modell geht von der Differentialgleichung (5) (in II. 2.) aus und löst diese unter der Bedingung konstanter Parameter $T_C$, GF und L; außerdem werden Nekrosezonen vernachlässigt. Dies führt zu einer Lösung der Form

$$V(t) = V(0) \cdot \exp ( ( k - L ) \cdot t ) \qquad (19)$$

(k= Zellproduktionsrate, L= Zellverlustrate)

also zu einem exponentiellen Wachstum.

Nun wird die Voraussetzung konstanter Parameter jedoch wieder verlassen und diese als Zeit- und Tumorgrößen-abhängig angenommen. Anschaulich bedeutet dieser Weg, die genannte Differentialgleichung zu lösen, daß an die Wachstumskurve V(t) stückweise Exponentialfunktionen angepaßt werden, daß also für gewisse Zeitintervalle die tumorkinetischen Parameter als konstant angesehen werden, diese sich aber von einem Intervall zum anderen ändern können. Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieser Methode ist es demnach, daß $T_C$, GF und L etwa über eine Verdopplungszeit hinweg sich nur geringfügig ändern.

Es wird zur Beschreibung des Anteils proliferierender Zellen am Gesamttumor ein Parameter a verwandt, der die Zahl der pro Mitose neu entstehenden P-Zellen bezeichnet. Dies führt zu:

$$k_P = \frac{\ln a}{T_C} \qquad \text{mit} \qquad 1 \leq a \leq 2 \tag{20}$$

und

$$V_P(t) = V(0) \cdot \exp\left( \left( \frac{\ln a}{T_C} - L \right) \cdot t \right) \tag{21}$$

Bei Vernachlässigung von Zellverlusten bedeutet $a = 1$ konstante Tumorgröße, $a = 2$ exponentielles Wachstum mit $T_d = T_C$.
Für einen hinreichend großen Tumor, das heißt für einen Tumor, bei dem $V(0)$ gegen $V(t)$ vernachlässigbar klein ist, stimmt die Differenz $a-1$ mit der Wachstumsfraktion GF überein. Dies ist darauf zurück zu führen, daß $V_P \cdot a$ das mittlere Volumen der nach einer Zykluszeit $T_C$ entstandenen P-Zellen bedeutet und daher $V_P \cdot (a-1)$ das Gesamtvolumen der so neu entstandenen P-Zellen wiedergibt. $(a-1)$ ist also das Verhältnis dieses Volumens zu $V_P$ und damit zum Volumen aller sich teilenden Zellen. Somit ist $(a-1)$ das Verhältnis des Volumens aller neuen P-Zellen zu dem durch Mitosen neu entstandenen Volumen ( $= 2 V_P - V_P = V_P$ ):

$$a - 1 = \lim_{t \to \infty} \frac{\text{Neue P-Zellen}}{\text{Neue Zellen}} = GF = \frac{\text{P-Zellen}}{\text{Gesamttumor}}$$

Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß Zellverluste gleichermaßen P- wie Q-Zellen betreffen.
Die Bedeutung dieses Modells liegt darin, daß die genannten Vereinfachungen es erlauben, Wachstumsfraktion GF und Zellverluste auf einfache Weise abzuschätzen. Dies geschieht durch die Berechnung folgender Größen:

$T_{d,pot}$ die sogenannte potentielle Verdopplungszeit, d.h. die Zeit, die der Tumor zur Verdopplung seiner Größe benötigen würde, wenn er keinen Zellverlusten unterworfen wäre

$T_d$ die wahre Verdopplungszeit, berechenbar aus der Wachstumsgeschwindigkeit

$p(\tau, t)$ die Altersverteilung der Tumorzellen; dies ist die Verteilung der Wahrscheinlichkeiten, in einem Tumor des Alters t eine Zelle des Alters $\tau$ zu finden.

Der Vergleich von $T_d$ und $T_{d,pot}$ ermöglicht die Bestimmung des Einflusses von Zellverlusten auf das Tumorwachstum:

$$L = \frac{\ln 2}{T_{d,pot}} - \frac{\ln 2}{T_d} = \frac{\ln a}{T_C} - \frac{\ln 2}{T_d} \qquad (22)$$

Mit Hilfe dieser beiden Verdopplungszeiten läßt sich auch der Zellverlustfaktor $\Phi$ berechnen. Dies ist eine dimensionslose Zahl, die durch das Verhältnis von Zellverlustrate zur Zellproduktionsrate definiert ist:

$$\Phi = \frac{L}{k} = 1 - \frac{T_{d,pot}}{T_d} \qquad (23)$$

$\Phi$ beschreibt den Wettbewerb zwischen Zellproduktion und Zellverlusten. $\Phi = 1$ heißt $T_{d,pot} \ll T_d$ und damit, daß Verluste eine bedeutende Rolle spielen, $\Phi = 0$ entsprechend, daß kein Zellverlust vorliegt. Auch in diese Anwendung der beiden Verdopplungszeiten geht wieder die bereits genannte Voraussetzung ein, daß Zellverluste gleichermaßen P- wie Q-Zellen betreffen.
Die Funktion $p(\tau, t)$ wird dazu verwandt, die theoretische Zahl von Zellen in den einzelnen Zyklusphasen zu berechnen und durch den Vergleich mit Ergebnissen aus Markierungsexperimenten (Mitose- und Markierungsindices) Angaben zur Wachstumsfraktion zu gewinnen. Durch die Verwendung der exponentiellen Lösung (19) erhält $p(\tau, t)$ eine besonders einfache Form:

$$p(\tau, t) = \frac{a(t) \cdot \ln a(t)}{(a-1) \cdot T_C} \cdot \exp\left(\left(-\frac{\ln a}{T_C} + L\right) \cdot \tau\right) \qquad (24)$$

Die autoradiographisch meßbaren Mitoseindices (MI) und Markierungsindices (LI) erhält man bei bekannter Dauer der einzelnen Phasen des Zellzyklus durch zeitliche Integration von $p(\tau, t)$. Der Mitoseindex bezeichnet den Anteil der Zellen in der Mitosephase an der Gesamtzellzahl und wird demnach durch

$$MI = \int_{T_{G1}+T_S+T_{G2}}^{T_C} p(\tau, t) \cdot d\tau \tag{25}$$

bestimmt. Entsprechend gilt für den Markierungsindex, der den (markierbaren) Anteil der Zellen in der S-Phase wiedergibt:

$$LI = \int_{T_{G1}}^{T_S+T_{G1}} p(\tau, t) \cdot d\tau \tag{26}$$

Der Vergleich der so berechneten mit entsprechenden gemessenen Werten liefert Aussagen über $a(t)$ beziehungsweise über $GF(t)$.

## Anwendungsmöglichkeiten dieses Modells auf das Sarkom-180

Die Verwendung des hier beschriebenen Modells setzt voraus, daß die die Tumorkinetik beschreibenden Parameter zumindest näherungsweise konstant sind, daß Zellverluste gleichermaßen P- wie Q-Zellen betreffen und daß Nekrosezonen des Tumors vernachlässigbar klein sind.

Die Konstanz der Parameter $T_C$, GF und L bedeutet gleichzeitig, daß die relative Wachstumsrate $\dot{V}(t)/V(t)$ konstant sein müßte. Wie die Abbildungen 13 und 18 zeigen, kann die Wachstumskurve nur sehr unvollkommen durch stückweise Anpassung von Exponentialfunktionen, im halblogarithmischen Maßstab dieser Abbildungen wären dies Geraden, wiedergegeben werden und die relative Wachstumsrate kann keineswegs als konstant angesehen werden. Die nicht-invasive Messung der Wachstumsfraktion ergab Werte von GF, deren relative Änderung pro Tag konstant bei 12% liegt.

Diese experimentellen Resultate schließen eine Anwendung dieses

Modells auf das Sarkom-180 weitgehend aus. Dennoch bietet diese Beschreibung der Tumorkinetik eine Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Wachstumskinetik des hier untersuchten Tumor-Systems zu ziehen. Diese Möglichkeit beruht auf der Tatsache, daß Markierungs - und Mitoseindices, die unter der Verwendung der Altersverteilung $p(\tau, t)$ berechnet werden, innerhalb experimentell realisierbarer Fehler unabhängig sind von dem in diese Funktion eingehenden Modell. Dies zeigt sich an der Tatsache, daß bei der Bestimmung von GF(t) aus $p(\tau, t)$ durch

$$GF(t) = \frac{LI_{gemessen}}{LI_{theoretisch}} = \frac{LI_{gemessen}}{\int_{T_{G1}}^{T_S} p(\tau, t)\, d}$$

sich nur geringfügige Unterschiede für GF ergeben, wenn $p(\tau, t)$ einmal unter der Annahme eines exponentiellen Wachstums, ein anderes Mal eines stationären Zustands ( $\dot{V}(t) = 0$ ) berechnet wird; die maximale Abweichung liegt bei etwa 5%.

Die Berechnung von GF aus den autoradiographischen Ergebnissen erfordert die Kenntnis der Zellverlustrate, wobei auch hier wieder die Voraussetzung eingeht, daß sich die Zellverluste in gleicher Weise auf alle drei Tumorzellgruppen (P, Q, N) auswirken. Die Resultate der Autoradiographien (Tabelle 1) führen zu Wachstumsfraktionen, die in Abhängigkeit von der zur Berechnung von GF jeweils angenommenen Verlustrate in Abbildung 20 aufgetragen sind. Man erkennt, daß die Verluste nur einen geringen Einfluß auf GF haben; ein Anwachsen der Verlustrate von 0 auf $1\%h^{-1}$ verändert GF um maximal 5 %. Hiermit zeigt sich aber gleichzeitig, daß umgekehrt GF sehr genau bekannt sein muß, um die Verlustrate berechnen zu können, daß auch die Genauigkeit der autoradiographischen Methode mit den Einschränkungen der hier eingehenden Modelle keine ausreichend genaue Bestimmung von L zuläßt.

In Kombination mit der nicht-invasiven Messung der relativen Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)/V(t)$ können jedoch GF- und L-Werte

bestimmt werden, die sowohl Gleichung (26) als auch Gleichung (10) ( in II. 3) erfüllen, die also in den Schnittpunkten der Geraden der Abbildung 20 liegen. Dies führt zu den in Tabelle 6 aufgeführten Werten.

| Tumoralter (d) | GF (%) | L (%/h) | L (nicht-inv.) (%/h) |
|---|---|---|---|
| 5 | 54 | 1,1 | 0,9 |
| 7 | 46 | 1.0 | 0,9 |
| 11 | 30 | 0,4 | 0,4 |

Tab. 6 Wachstumsfraktion GF und mittlere Verlustrate L, berechnet aus den Ergebnissen der autoradiographischen Messungen, im Vergleich zur nicht-invasiv bestimmten Verlustrate

Die Wachstumsfraktionen stimmen sehr gut mit den Ergebnissen überein, die sich aus der nicht-invasiven Einbauratenmessung ergaben ( Tabelle 5 ). Tabelle 6 enthält außerdem auch Verlustraten, die sich aus den Ergebnissen der nicht-invasiven Bestimmung von GF und aus Gleichung (10) ( in II. 3 ) errechnen lassen; auch hier findet sich weitgehende Übereinstimmung dieser auf sehr verschiedenen Wegen ermittelten Größe.
Die Möglichkeit, das Tumormodell von Steel zur Auswertung der autoradiographischen Ergebnisse anzuwenden, bestätigt die Resultate der nicht-invasiven Messungen, insbesondere der Bestimmung von GF(t) aus der Messung der IUdR-Einbaurate.
Es zeigt sich auch hier, daß Zellverluste einen geringen Einfluß auf das Wachstum des Sarkoms-180 haben und GF sehr genau bekannt sein muß, um eine mittlere Verlustrate L berechnen zu können. Die aus den angegebenen GF-Werten ermittelten Beträge von L weichen bei den kleinen Tumoren deutlich von denen der Aktivitätsverlustratenmessung ab. Erst bei dem größten der drei untersuchten

Tumore findet sich eine ausreichende Übereinstimmung. Daraus muß geschlossen werden, daß zur Deutung der Aktivitätsverlustraten Wiederverwertung, Nekrose und die Zeitabhängigkeit der Verteilung der markierenden Aktivität auf die Zellpopulation nicht vernachlässigt werden können. Dies konnte durch neuere invasive Messungen an einem anderen Tumorsystem bestätigt werden (Porschen 1978).

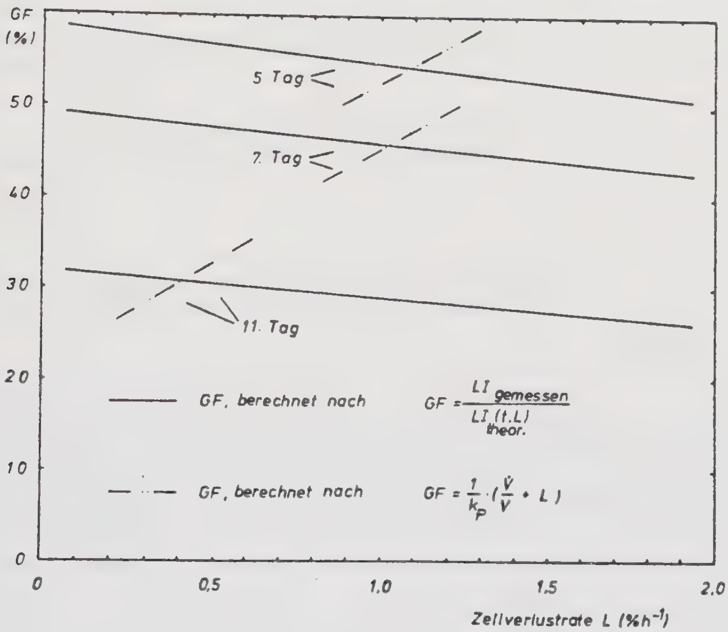



Abb. 20 Abhängigkeit der aus $p(\tau, t)$ beziehungsweise aus $\dot{V}(t)/V(t)$ berechneten Wachstumsfraktion GF von der Zellverlustrate L

V.1. Mendelsohn-Modell

Dieses Modell hat gegenüber dem beschriebenen Modell von Steel den Vorzug, daß auf die Voraussetzung einer konstanten Wachstums-fraktion verzichtet werden kann, jedoch den Nachteil, daß Zellverluste nicht explizit enthalten sind und vor allem Verluste von Q-Zellen nur schwer zu berücksichtigen sind.
Das Modell geht von der Differentialgleichung

$$\dot{V}(t) = \frac{w}{T_C} \cdot V_P(t) = \frac{w}{T_C} \cdot GF(t) \cdot V(t) \qquad (26)$$

aus und verwendet den speziellen Ansatz:

$$V_P(t) = g \cdot V^{b}$$

mit konstantem g und b.
w ist eine Proportionalitätskonstante, die von der Lage der S-Phase im Zellzyklus abhängt und die daher einen wichtigen Parameter der Altersverteilung der Tumorzell-Population darstellt.
Man erkennt, daß dieser Ansatz sowohl exponentielles ( b=1), lineares ( b=0 ) als auch stationäres ( g=0 ) Wachstum als Grenzfälle erfaßt.
Für die Wachstumsfraktion erhält man so:

$$GF = g \cdot V^{b-1} \qquad (27)$$

und die Differentialgleichung lautet dann:

$$\dot{V}(t) = \frac{w}{T_C} \cdot g \cdot V^{b} \qquad (28)$$

Sie läßt sich lösen durch:

$$V(t) = \left( (1-b) \cdot \frac{w}{T_C} \cdot g \cdot t + V(0)^{1-b} \right)^{\frac{1}{1-b}} \qquad (29)$$

wenn $b \neq 1$

und durch

$$V(t) = V(0)\cdot \exp\left( \frac{\ln (GF+1)}{T_C}\cdot t \right)$$

für b=1.

Die Anwendbarkeit dieses Modells auf ein bestimmtes Tumorsystem läßt sich einfach überprüfen, denn Gleichung (28) liefert:

$$\ln (\dot{V}(t)) = b\cdot \ln( V(t) ) + \ln \left(\frac{w}{T_C}\cdot g \right) \tag{30}$$

Eine doppelt logarithmische Auftragung der Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)$ gegen $V(t)$ muß demnach bei Gültigkeit des Ansatzes der Gleichung (27) eine Gerade liefern, durch deren Steigung b bestimmt werden kann.

Besondere Bedeutung kommt diesem Ansatz zu für einige solide Tumore, deren Wachstumskurve für b den Wert 2/3 liefert. Ein solches Ergebnis läßt sich leicht anschaulich geometrisch deuten (Mayneord 1932 )durch einen kugelförmigen Tumor, der von seiner Oberfläche her versorgt wird, in den also nur wenige Kapillare einwachsen. Das Volumen $V_P$ der proliferierenden Zellen wird dann bestimmt durch die Oberfläche dieser Kugel, also durch $V^{2/3}$.

Im Rahmen dieses Modells lassen sich Zellverluste nicht in der bisher angewandten Form als Produkt aus einer Verlustrate und dem Tumorvolumen berücksichtigen, da in der Differentialgleichung

$$\dot{V}(t) = \frac{w}{T_C}\cdot V^b\cdot g - L\cdot V$$

der zu V proportionale Term zu meist divergenten Integralen führt, die nur dann lösbar sind, wenn die Verluste die Zellproduktion überwiegen, der Tumor also kleiner wird.

Anwendungsmöglichkeiten dieses Modells auf das Sarkom-180

Wie bereits beschrieben, kann die Anwendbarkeit dieses Modells auf das hier untersuchte Tumorsystem einfach überprüft werden durch eine doppelt logarithmische Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)$ in Abhängigkeit vom Tumorvolumen V(t). Dies ist in der Abbildung 21 geschehen. Die untere der beiden Meßreihen zeigt die Wachstumsdaten der Tabelle 4, die obere die gleichen Werte, zu denen jedoch die Beiträge der Zellverluste hinzu addiert wurden. Der Betrag der Zellverlustrate wurde aufgrund der Resultate der Tabelle 6 zu $1\%h^{-1}$ angenommen.

Durch beide Meßreihen läßt sich innerhalb der experimentellen Fehler je eine Gerade legen, doch zeigt die obere der beiden Darstellungen eine deutlich höhere Linearität als die untere. Es wurde an diese Punkte rechnerisch eine Gerade angepaßt und es ergab sich:

$$\dot{V}(t) = 0,09 \cdot V^{0,78}$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,996$.

Durch den Vergleich der Gleichung (26) mit Gleichung (10) (in II. 3) läßt sich aus diesem Ergebnis und der bekannten Zellzykluszeit $T_C$ eine Gleichung für GF bestimmen

$$GF = 2,1 \cdot V^{-0,22}$$

und es ergeben sich daraus für den 5. Tag nach Implantation 56%, für den 7. Tag 44% und den 11. Tag 36%, also Werte die sehr gut mit den aus der IUdR-Einbaurate oder den Autoradiographien bestimmten Ergebnissen übereinstimmen.

Das Mendelsohn-Modell liefert also auch für dieses Tumorsystem relativ gute Resultate, setzt aber die Kenntnis der Zellverlustrate voraus.

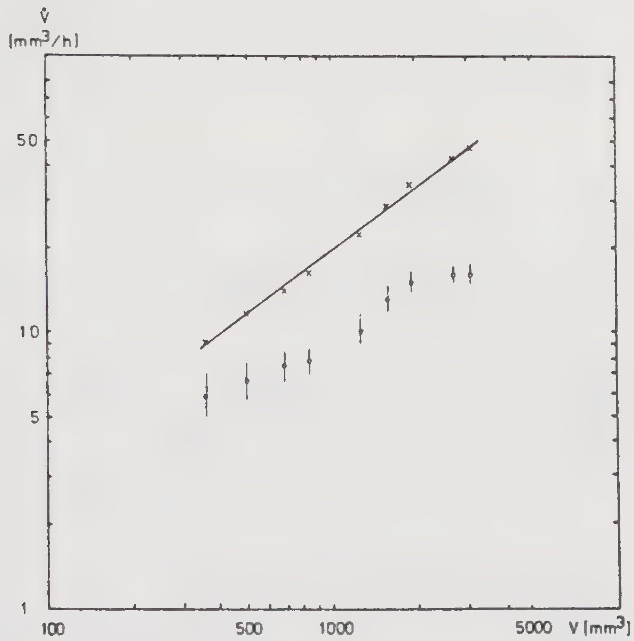



Abb. 21 Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit $\dot{V}(t)$ vom Tumorvolumen V(t)

## V.3. Beschreibung des Tumorwachstums durch eine Gompertzfunktion

Der Ausgangspunkt dieser Beschreibung des Tumorwachstums ist nicht eine Differentialgleichung, etwa in der Form der Gleichung (10), sondern die empirische Anwendung einer Funktion, deren Anpassung an Tumorwachstumskurven sich für zahlreiche Tumor-Systeme bewährt hat.

Die sogenannte Gompertzfunktion wird durch

$$V(t) = V(o)\cdot \exp\left(\frac{A}{B}(1 - \exp(-B\cdot t)\right) \qquad (31)$$

definiert. Sie wird bestimmt durch zwei freie, zeitunabhängige Parameter A und B und ist charakterisiert durch eine exponentiell abfallende relative Steigung:

$$\frac{\dot{V}(t)}{V(t)} = A\cdot \exp(-B\cdot t) \qquad (32)$$

Für einen kleinen Tumor ( $t \ll 1/B$ ) gilt :

$$V(t) = V(o)\cdot \exp(A\cdot t)$$

für einen großen Tumor:

$$V(t) = V(0)\cdot \exp\left(\frac{A}{B}\right)$$

Diese Funktion beschreibt also den Verlauf einer Kurve, die zunächst exponentiell ansteigt, deren relative Steigung ($\dot{V}(t)/V(t)$ ) dann rasch abnimmt, die durch einen Wendepunkt läuft und die asymptotisch einem Grenzwert zustrebt.

Der Wendepunkt liegt bei

$$t_{Wpkt.} = \frac{1}{B} \ln A/B$$

und in diesem Punkt gilt:

$$\frac{\dot{V}(t)}{V(t)} = B$$

Die relative Wachstumsgeschwindigkeit ist nicht konstant, das heißt, die Verdopplungszeit des Tumors ist zeitabhängig:

$$T_d = -\frac{1}{B}\cdot \ln\left(1 - \frac{B\cdot \ln 2}{A}\cdot \exp(B\cdot t)\right)$$

Die Parameter, die die beste Übereinstimmung der empirisch angewandten Gompertzfunktion mit der gemessenen Wachstumskurve ergeben, lassen sich auf zwei verschiedenen Wegen bestimmen: einmal durch eine Computeranpassung beider Parameter an die Meßwerte ( z.B. durch $\chi^2$-Fitprogramme ), zum anderen durch eine Geradenanpassung der halblogarithmisch aufgetragenen relativen Wachstumsrate $\dot{V}(t)/V(t)$ gegen das Tumoralter t ( Gleichung (32) ). Die erste Methode hat den Vorteil höherer Reproduzierbarkeit, ist jedoch nicht immer leicht durchführbar, da die beiden Parameter nicht unabhängig voneinander sind. Der zweite Weg ist wesentlich einfacher, erfordert jedoch die Kenntnis der relativen Wachstumsgeschwindigkeiten, deren Ermittlung aus den Wachstumskurven starken subjektiven Einflüssen unterworfen ist.
Die besondere Bedeutung, die der Verwendung der Gompertz-Funktion bei der Beschreibung von Wachstumskurven zukommt, liegt in der dadurch gegebenen Möglichkeit, verschiedene Wachstumskurven einfacher miteinander vergleichen zu können. Möglich werden dadurch Vergleiche des Wachstums verschiedener Tumor-Wirt-Systeme und Vergleiche des Wachstums eines Tumors bei verschiedenen "Störungen", wie zum Beispiel Therapien.
Der Vergleich verschiedener Tumor-Wirt-Systeme wurde anhand zahlreicher Messungen von Laird ( 1964 ) durchgeführt. Es zeigte sich, daß die untersuchten Systeme eine Reihe bedeutender Gemeinsamkeiten aufwiesen; zum Beispiel stellte es sich heraus, daß der Quotient A/B und damit das Verhältnis des theoretischen maximalen Tumorvolumens zur Ausgangsgröße V(0) zwischen den einzelnen

Tumortypen nur geringfügig variiert und nahezu unabhängig ist von der Ausgangszellzahl. Gleichzeitig stellte Laird fest, daß Mäusetumore diesen theoretischen Maximalwert weitgehend erreichen, dies aber beispielsweise für Ratten nur selten der Fall ist.
Ein Versuchstier stirbt, wenn der Tumor eine maximal tolerierbare Größe erreicht; es besteht die Hoffnung ( Laird 1964 ), durch die vergleichende Beobachtung von Therapiewirkungen Möglichkeiten zu finden, die Wachstumsverzögerung so stimulieren zu können, daß die theoretisch maximale Tumorgröße unter diese Grenze fällt. In jedem Fall bedeutet ein Erhöhung der Wachstumsretardierung, also die Abnahme der relativen Wachstumsgeschwindigkeit, eine Verzögerung des Zeitpunkts, in dem diese Toleranzgrenze überschritten wird.

Die Anwendung der Gompertz-Funktion auf Tumorwachstumskurven ermöglicht es, zum Vergleich verschiedener Wachstumskurven die Zeitskala und die Tumorgrößen so zu normieren, daß einzelne Punkte dieser Kurven miteinander verglichen werden können. So konnte Laird ( 1964 ) zeigen, daß das Wachstum zahlreicher Mäusetumore durch eine gemeinsame Kurve wiedergegeben werden kann, wenn die Zeitskala auf ein gemeinsames B, der Zeitnullpunkt auf eine gemeinsame Lage des Wendepunktes und die Tumorgröße auf den jeweiligen Maximalwert normiert werden. Die Lage der Meßpunkte eines bestimmten Tumorsystems auf dieser normierten Kurve liefert Informationen über die Anwendbarkeit der Gompertz-Funktion für dieses spezielle System, aber auch Aussagen über den Einfluß der Wachstumsverzögerung (Laird 1964). Diese Normierung der Gompertz-Funktionen verschiedener Tumore erlaubt die Berechnung bestimmter gut vergleichbarer Punkte, beispielsweise des Zeitpunktes, zu dem theoretisch nur eine einzelne Zelle im Tumor vorlag. Dieser Punkt wird dazu benutzt, die Anzahl der Verdopplungen zu berechnen, die der Tumor benötigt, um das theoretische Maximum zu erreichen : diese Zahl ist bei allen untersuchten Tumoren nahezu identisch ( ca. 30 ).

Die Verwendung der Gompertz-Funktion bietet also zahlreiche Mög-

lickeiten, Informationen aus Wachstumskurven zu gewinnen. Da dieser Weg jedoch nicht von einer Differentialgleichung mit ihren anschaulichen Parametern wie Zellproduktion oder Zellverlust ausgeht, erhält man aus der bisher rein empirischen Anwendung dieser Funktion nur sehr wenige Aussagen über das Geschehen, das das mit ihrer Hilfe beschriebene Wachstum bestimmt.

Anwendung der Gompertz-Funktion auf das Sarkom-180

Charakteristisch für die Gompertz-Funktion ist die exponentielle Abnahme der relativen Steigung $\dot{V}(t)/V(t)$. Diese Eigenschaft zeigte sich aber auch bei den hier untersuchten Wachstumskurven des Sarkoms-180. Dies wird deutlich in Gleichung (13) ( in IV. 3 ) und in Abbildung 18. Gleichung (13) ergibt:

$$A = 0{,}024 \ h^{-1} \qquad B = 0{,}0043 \ h^{-1} \qquad (33)$$

Abbildung 22 vergleicht die mit diesen Parametern berechneten Tumorvolumina mit den tatsächlich gemessenen ; die Übereinstimmung ist sehr gut, der Korrelationskoeffizient beträgt $r^2 = 0{,}97$. Das Anfangsvolumen V(0) wurde durch eine Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt.

Solche Anpassungen von Gompertz-Funktionen wurden an alle im Rahmen dieser Untersuchung diskutierten Wachstumskurven durchgeführt ( vgl. Tabelle 2 und Sommer 1977 ). Es zeigte sich in allen Fällen die gute Anwendbarkeit dieser Funktion auf das Sarkom-180. Auch wenn die Parameter A und B von einer Transplantationsserie zur anderen schwankten, deutete sich doch die von Laird ( 1964 ) aufgezeigte Korrelation zwischen A und B an, die sich in der näherungsweisen Konstanz des Quotienten A/B äußerte.

Über diese rein empirische Beschreibung des Tumorwachstums durch Gompertz-Funktionen hinaus bieten sich diese für eine Verallgemeinerung als Ansatz eines Tumormodells an. Dies wird möglich

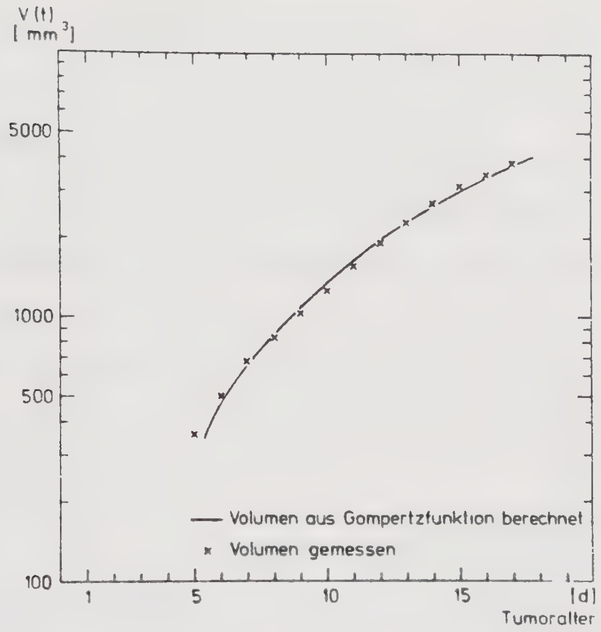



Abb. 22 Anpassung einer Gompertz-Funktion an eine Tumorwachstumskurve

durch eine Deutung der Gompertz-Funktion als Lösung der beiden gekoppelten Differentialgleichungen

$$\dot{V}(t) = A' \cdot V(t) \cdot \frac{1}{R(t)} \qquad (34)$$

$$\dot{R}(t) = B \cdot R(t)$$

Übertragen auf das Tumorwachstum, beschreibt dieses Gleichungssystem ein zum Tumorvolumen proportionales Wachstum mit einer Retardierungsfunktion R(t). Sie führen, bei konstantem A und B, zu den Lösungen

$$R(t) = R(0) \cdot \exp(B \cdot t)$$

$$\dot{V}(t) = A' \cdot V(t) \cdot \exp(-B \cdot t) \cdot \frac{1}{R(0)}$$

und daher zu

$$V(t) = V(0) \cdot \exp\left( \frac{A'/R(0)}{B} \cdot (1 - \exp(-B \cdot t)) \right)$$

also zu einer Lösung in Form einer Gompertz-Funktion.
A beschreibt hier also den Proportionalitätsfaktor von Volumenwachstumsgeschwindigkeit und Tumorvolumen; bei nicht vorhandener Retardierung des Wachstums, also R(t) = konstant beziehungsweise B = 0, würde sich ein exponentielles Wachstum ergeben mit der Zeitkonstanten A.
B gibt die Zeitabhängigkeit der Wachstumsretardierung wieder, ohne allerdings Aussagen zu deren Natur zu machen; es liegt lediglich deren mathematische Form fest:

$$\frac{\dot{R}(t)}{R(t)} = B = \text{konstant}$$

Dieser Deutung entsprechend würde A das Tumorwachstum bestimmen bei konstanten tumorkinetischen Parametern, während B die Zeitabhängigkeit dieser Größen wiedergibt, die ja zur Wachstumsretardierung führt. Diese Interpretation bestätigt sich durch den Vergleich der beiden Gleichungen (32) und (10) ( in II. 3. ). Man erhält:

$$A \cdot \exp(-B\,t) = k_P \cdot GF(t) - L(t)$$

Da beide Parameter A und B zeitunabhängig sind, kann diese Beziehung für den Zeitpunkt t=0 ausgewertet werden; es ergibt sich so:

$$A = k_P \cdot GF(0) - L(0) = \text{Netto-Zellproduktionsrate } (t=0)$$

A ist also der Parameter, der das nicht-retardierte Wachstum des Tumors bestimmt und der nur durch zeitunabhängige Größen festgelegt ist. Diese Deutung von A erlaubt bei bekannter Zellverlustrate die Berechnung der Zellzykluszeit. Verwendet man, unter Vernach-

lässigung von Nekrosen und Wiederverwertung, die IUdR-Aktivitätsverlustrate anstelle von L, so ergibt sich $T_C = 24 \pm 9$ Stunden, bei Verwendung der autoradiographisch bestimmten Verlustrate der Wert $T_C = 20 \pm 6$ Stunden, die beide in Anbetracht der hier eingehenden Vereinfachungen ( zum Beispiel GF(0) = 1 ) und der experimentellen Fehler gut mit dem Meßwert von 16 Stunden übereinstimmen.
Eine ähnliche anschauliche Deutung wie für A ist auch für den Parameter B möglich. B ist das Maß für die zeitliche Veränderung der zellkinetischen Parameter:

$$\exp(-B\,t) = \frac{k_P \cdot GF(t) - L(t)}{k_P \cdot GF(0) - L(0)} \qquad (35)$$

Wie die Übereinstimmung der Steigungen der beiden Geraden in Abbildung 18 zeigt, gibt B vor allem die Zeitabhängigkeit der Wachstumsfraktion GF(t) wieder. Wird die Zeitabhängigkeit von GF(t) vollständig durch die Gleichung (15) beschrieben, wie es für die Berechnung der Tabelle 5 angenommen wurde, so folgt aus Gleichung (35), daß auch L(t) exponentiell mit dem Tumoralter abnimmt. Die experimentellen Fehler der Einbauratenmessung lassen jedoch in der Gleichung (15) noch einen, nicht-signifikant nachweisbaren, additiven, konstanten Term der Größenordnung $L/k_P \cdot c$ (vgl. IV. 3) zu, der zusammen mit Gleichung (35) zu einer konstanten Verlustrate führen würde. Die experimentellen Fehler erlauben also auch hier keine endgültige Aussage über die Zeitabhängigkeit der mittleren Zellverlustrate.

Die hier gefundenen Interpretationen der Parameter A und B bietet gleichzeitig eine Möglichkeit zum Verständnis der von Laird gefundenen Korrelation zwischen A und B. Gleichung (35) zeigt, daß B mit wachsendem A größer wird und umgekehrt. Das heißt, je schneller die mit A beschriebene Proliferation des Tumors abläuft, um so schneller wirkt auch die Tumorretardierung. Bei einem schnell wachsenden soliden Tumor verschlechtert sich die Versorgungslage der Zellen schneller als bei einem langsam wachsenden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführten Messungen dienten der Ermittlung der tumorkinetischen Parameter, die das Wachstum des soliden Experimentaltumors Sarkom-180 bestimmen.
Die Messung der Zellzykluszeit geschah autoradiographisch zu verschiedenen Stadien des Tumorwachstums. Die Dauer des Zellzyklus erwies sich innerhalb der experimentellen Fehler als unabhängig vom Alter und der Größe des Tumors; sie beträgt im Mittelwert 16 $\pm$ 2 Stunden.
Alle weiteren tumorkinetischen Messungen wurden ausschließlich mit Hilfe nicht-invasiver Methoden durchgeführt, nachdem Untersuchungen der Tumorgeometrie gezeigt hatten, daß sich das Tumorvolumen aus dem nicht-invasiv meßbaren Tumordurchmesser berechnen läßt.
Die regelmäßige Ermittlung des Tumorvolumens in Abhängigkeit vom Tumoralter ergab in allen untersuchten Fällen Tumorwachstumskurven, die eine deutliche Abnahme der relativen Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmendem Alter zeigten. Diese Retardierung des Tumorwachstums kann wegen der Konstanz der Zellzykluszeit nicht auf eine Verringerung der Proliferationsgeschwindigkeit zurückgeführt werden. Die Erklärung dieser Wachstumsverzögerung lieferte die Messung der Proliferationsaktivität mit Hilfe der IUdR-Technik. Es zeigt sich, daß diese in dem gleichen Maß absinkt wie die relative Wachstumsgeschwindigkeit. Der hohe Grad der Übereinstimmung dieser beiden Zeitabhängigkeiten erlaubt den Schluß, daß die Wachstumsretardierung vollständig auf eine Abnahme der Wachstumsfraktion, das heißt des Anteils der an der Proliferation beteiligten Tumorzellen, zurückgeführt werden kann. Es war so möglich, diese Wachstumsfraktion aus der nicht-invasiven Messung des Einbaus von IUdR in den Tumor zu berechnen.
Der dritte wichtige tumorkinetische Parameter, die Zellverlustrate,

konnte bei bekannter Wachstumsfraktion und Zellzykluszeit sowohl aus den Ergebnissen der Autoradiographien als auch der nicht-invasiven IUdR-Einbaumessung abgeschätzt werden. Der Zusammenhang zwischen der relativen Wachstumsgeschwindigkeit und der Proliferationsaktivität legt den Schluß nahe, daß die mittlere Zellverlustrate ebenfalls unabhängig vom Tumoralter ist. Dies wird auch durch die Konstanz der ebenfalls mit Hilfe der IUdR-Technik gemessenen Aktivitätsverlustrate angedeutet, deren Anwendbarkeit als Verlustratenmessung jedoch Einschränkungen unterliegt, die nur invasiv nachprüfbar sind.

Im Verlaufe der weiteren Untersuchung wurde die Anwendbarkeit zweier häufig benutzter tumorkinetischer Modelle auf das hier untersuchte Tumor-System überprüft und diese zur weiteren Auswertung der autoradiographischen Resultate angewandt.
Die Verwendung der Gompertz-Funktion führte zu einer sehr guten Beschreibung der am Sarkom-180 beobachteten Wachstumskurven. Über diese bisher ausschließlich empirische Verwendung dieser Funktion hinaus gelang es hier, den Parametern der Gompertz-Funktion anschauliche tumorkinetische Bedeutungen zu zuordnen. Die Deutung dieser Parameter ermöglicht, bei bekannter Zellverlustrate, die nicht-invasive Abschätzung der Zellzykluszeit, die zu Resultaten führte, die trotz der hier eingehenden Vereinfachungen und experimentellen Fehlern vergleichbar sind mit den autoradiographisch ermittelten.

# VII. LITERATUR

ANDREEFF, M.:

Wirkung verschiedener neuer Cytosatika auf DNS-Reduplikation und die Proliferationskinetik am Modell des Ehrlich-Ascites Tumors

Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med. 80 (1974)

ANDREEFF, M.:

Die Zellkinetik der spontanen und der durch Chemo- und Radiotherapie modifizierten Progression von Transplantationstumoren

Habilitationsschrift , Heidelberg 1975

ANDREEFF, M.:

Zellkinetik des Tumorwachstums

Stuttgart, Thieme Verlag 1977

BAISCH, H.; GÖHDE, W.; LINDEN, W. A.:

Analysis of PCP-data to determine the fraction of the cells in the various phases of the cell cycle

Rad. Env. Biophys. 12: 31 (1975)

BARRETT, J. C.:

A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data

J. Natl. Canc. Inst. 37: 443 (1966)

BEGG, A.:

Cell loss from several types of solide murine tumors: Comparison of 125-J-Iododeoxyuridine and tritiated Thymidine methods

Cell. Tiss. Kin. 6: 409 (1973)

BOSILJANOFF, P.; PORSCHEN, W.; PIEPENBRING, W.; MÜHLENSIEPEN, H.; FEINENDEGEN, L. E.:

In-vivo Untersuchungen über die relative Strahlenempfindlichkeit von hypoxischen Tumorzellen

Strahlentherapie 153: 178 (1976)

BRONSTEIN-SEMENDJAJEW:

Taschenbuch der Mathematik

Verlag Harri Deutsch, Frankfurt/M. 1973

CLEAVER, J. F.:

Thymidin metabolism and cell kinetics

North Holland Research Monographs
Frontiers in Biology 6
Amsterdam 1967

COMMERFORD, S. L.:

Biological stability of 5-Iodine-2-Deoxyuridine labeled with Iodine-125 after its incorporation into the Deoxyribonucleic Acid of the mouse

Nature 206: 949 (1965)

DENEKAMP, J.:

The cellular proliferation kinetics of animal tumours

Canc. Res. 30: 393 (1970)

DENEKAMP, J.:

The relationship between cell loss factor and the immediate response to irradiation in tumours

Europ. J. Canc. 8: 335 (1972)

DETHLEFSEN, L.A.:

An evaluation of radioiodine labeled 5-Iodo-2-Deoxyuridine as a tracer for measuring cell loss from solid tumors

Cell. Tiss. Kin. 4:123 (1971)

DETHLEFSEN, L.A.:

Incorporation of 125-Iodine-labeled 5-Iodo-2-Deoxyuridine into the DNA of mouse mammary tumors

Rec. Res. Canc. Res. 17: 186 (1969)

DETHLEFSEN, L.A.; SORENSON, J.; SNIVELY, J.:

Cell loss from three established lines of the C3H-mouse mammary tumor: a comparison of the 125-J-UdR and the H-3-TdR autoradiographic methods

Cell. Tiss. Kin. 10: 447 (1977)

DETHLEFSEN, L.A.; PREWITT, J.M.S.; MENDELSOHN, M.L.:

Analysis of tumor growth curves

J. Natl. Canc. Inst. 40: 389 (1968)

ERTL, H.H.; FEINENDEGEN, L.E.; HEINIGER, H.J.:

Iodine-125, a tracer in cell biology: physical properties and biological aspects

Phsysics in Medicine and Biology 15: 447 (1970)

FEINENDEGEN, L.E.; BOND, V.P.; HUGHES, W.L.:

125-J-DU in autoradiographic studies of cell proliferation

Exp. Cell. Res. 43: 107 (1966)

FEINENDEGEN, L. E.; BOND, V. P.; HUGHES, W. L.:
Physiological thymidine reutilization in rat bone marrow
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 448 (1966)

FEINENDEGEN, L. E.:
Tritium labeled molecules in Biology and Medicine
Monograph of the U.S. Atomic Energy Commission
and American Institute of Biological Sciences
Academic Press Inc. New York (1967)

FEINENDEGEN, L. E.:
Autoradiographische und biochemische Untersuchungen
zur Zellproliferationskinetik in-vivo
in: Präoperative Tumorbestrahlung
Deutscher Rötgenkongress 1970
O. Hug (Herausgeber), Urban & Schwarzenberg
München 1971

FEINENDEGEN, L. E.:
Zelluläre Aspekte der Strahlensensibilisierung
Strahlentherapie 143: 257 (1972)

FEINENDEGEN, L. E.; HEINIGER, H. J.; FRIEDRICH, G.; CRONKITE, E. P.:
Differences in reutilization of Thymidine in Hemopoietic and Lymphopoietic Tissues of the normal mouse
Cell. Tiss. Kin. 6: 573 (1973)

FEINENDEGEN, L. E.:
Biokybernetik und onkologische Cytokinetik
XIV. Tagung d. deutsch. Ges. f. Nuklearmedizin
Berlin (1976)

FOLKMAN, J.; GREENSPAN, H. P.:
Influence of geometry on control of cell growth
Biochimica et Biophysica Acta 417: 211 (1975)

FOX, B. W.; PRUSOFF, W. W.:
The comparative uptake of 125-J-labeled 5-Iodo-2-Deoxyuridine and Thymidine-3-H into tissues of mice bearing Hepatoma-129
Canc. Res. 25:234 (1965)

FRINDEL, E,; MALAISE, E. P.; ALPEN, E.; TUBIANA, M.:
Kinetics of cell proliferation of an experimental tumor
Canc. Res. 27: 1122 (1967)

GANZER, U.; HINZE, H. R.:
Mitoseindexbestimmung an in-vivo synchronisiertem menschlichem Tumorgewebe
Arch. Klin. exp. Ohr-, Nas. -u. Kehlk. -Heilk. 194: 388 (1969)

GEWEHR, K.:
Strahlensensibilisierung hypoxischer Tumorzellen
In-vivo Messungen der Wirksamkeit elektronenaffiner Verbindungen durch Zellmarkierung mit 125-Jod- und 131-Jod-Desoxyuridin
Inaugural-Dissertation, Düsseldorf 1977

HEINIGER, H. J.; FEINENDEGEN, L. E.; FRIEDRICH, G.; ERTL, H. H.:
Regional reutilization of Thymidine in the normal mouse
KFA Jülich Jül-Rep. -679 (1970)

HERMENS, A. F.:

Variations in the cell kinetics and the growth rate in an experimental tumour during natural growth and after irradiation

Rijswijk 1973

HOFER, K. G.; PRENSKY, W.; HUGHES, W. L.:

Death and metastatic distribution of tumor cells in mice monitored with 125-J-Iododeoxyuridine

J. Natl. Canc. Inst. 43: 463 (1969)

HOWARD, A.; PELC, S. R.:

The synthesis of Deoxyribonucleic Acid in normal and irradiated cells and its reaction to chromosome breakage

in: Oliver (Herausgeber), Symposion on Chromosome Breakage

Heredity 6: 261 (1953)

HUGHES, W. L.; COMMERFORD, S. L.; GITLIN, D.; KRÜGER, R. C.; SCHULTZE, B.; SHAH, V.; REILLY, P.:

DNA-metabolism in-vivo.

I. Cell proliferation and cell death as measured by incorporation and elimination of IUdR

Fed. Proc. 23: 640 (1964)

JANNSSON, B.:

Mathematical models in cell cycle kinetics

in: Mathematical Models in Biology and Medicine

Amsterdam 1974

JENTZSCH, K.:

Experimentelle Untersuchungen zur radiologischen Behandlung von synchronisierten Tumoren

Wien 1976

KLEIN, H.O.; LENNARTZ, K.J.:

Chemotherapy after synchronization of tumor cells

Seminars in Hematology 11: 203 (1974)

LAIRD, A.K.:

Dynamics of tumor growth

Brit. J. Canc. 18: 490 (1965)

LAIRD, A.K.:

Dynamics of tumor growth: comparison of growth rates and extrapolation to one cell

Brit. J. Canc. 18: 278 (1965)

LALA, P.K.; PATT, H.M.:

Cytokinetic analysis of tumor growth

Proc. N.A.S. 56: 1735 (1966)

LALA, P.K.:

Studies on tumor cell population kinetics

Methods in Cancer Research VI:1 (1971)

LALA, P.K.:

Age specific changes in the proliferation of Ehrlich-ascites Tumor

Canc. Res. 32: 628 (1972)

LEBLOND, C. P.; MESSIER, B.; KOPRIWA, B.:
Thymidine-3-H as a tool for the investigation of the renewal of cell populations
Lab. Invest. 8: 296 (1959)

MACDONALD, P. D. M.:
Stochastic models for the cell proliferation
in: von den Driesche (Herausgeber): Mathematical problems in biology
Victorian conference Berlin 1974

MAK, S.; TILL, J. E.:
The effects of X-rays on the progress of L-cells through the cell cycle
Rad. Res. 20: 2343 (1963)

MENDELSOHN, M. L.:
Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H-mice
J. Natl. Canc. Inst. 25: 485 (1968)

MENDELSOHN, M. L.:
The kinetics of tumor cell proliferation
Cellular Rediation Biology M. D. Anderson Hospital Symposion
William&Willkins Baltimore 498 (1965)

MENDELSOHN, M. L,; SHACKNEY, S. E.:
The growth kinetics of solid tumors
Cell. Tiss. Kin. 3: 405 (1970)

MENDELSOHN, M. L.; TAKAHASHI, M.:

A critical evaluation of the fraction of labeled mitoses method as applied to the analysis of tumours and other cell cycles

in: Basergha (Herausgeber) The Cell Cycle and Cancer New York 1971

MÜHLENSIEPEN, H.; PORSCHEN, W.:

Untersuchungen der zellkinetischen Parameter beim soliden Experimentaltumor Sarkom-180

KFA Jülich Interner Bericht 1976

NISHIOKA, B.:

Proliferation kinetics of Sarcoma-180

Gann 61: 563 (1970)

O'Farrell, T. P.; DUNAWAY, P. B.:

Incorporation and tissue distribution of a Thymidine analogue in the cotton rat

Comp. Biochem. Physiol. 22: 435 (1967)

PITTNER, W.:

Strahlenempfindlichkeit in Abhängigkeit vom Zellzyklus; in-vivo Untersuchungen am transplantierten Sarkom-180 mit 125-Jod-Deoxyuridin und 15 MeV-Neutronen

Inaugural-Dissertation, Düsseldorf 1972

PORSCHEN, R.:

Inaugural-Dissertation (in Vorbereitung)

PORSCHEN, W.; FEINENDEGEN, L. E.:

In-vivo Bestimmung der Zellverluste bei Experimentaltumoren mit markiertem Joddesoxyuridin

Strahlentherapie 137: 718 (1969)

PORSCHEN, W.; FEINENDEGEN, L. E.:

Cell loss rate in experimental tumor following 14 MeV neutron irradiation. In-vivo experiments with labeled iododeoxyuridine

IV. Int. Congress on Radiation Research
Evian 1970

PORSCHEN, W.; FEINENDEGEN, L. E.; MÜHLENSIEPEN, H.; PIEPENBRING, W.; BOSILJANOFF, P.:

In-vivo measurements of radiosensitivity of different cell populations within Sarcoma-180 in mice

V. Int. Congress on Radiation Research
Seattle 1974

PORSCHEN, W.:

Zellkinetische Untersuchungen bei einem soliden Experimentaltumor (Sarkom-180) unter in-vivo Bedingungen, externe Messungen mit Hilfe von markiertem Joddesoxyuridin

KFA Jülich Interner Bericht 1974

PRESCOTT, D. M.:

The composition of cell life cycle

Rec. Res. Canc. Res. 17: 79 (1969)

PRUSOFF, W. H.; JAFFE, J. J.:
Studies on the pharmacology of 5-Iodo-Deoxyuridine, an analogue of Thymidine
Biochem. Pharm. 3: 1246 (1960)

RAJEWSKY, M. F.:
Synchronisation in-vivo: kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA-synthesis with Hydroxyurea
Exp. Cell. Res. 60: 269 (1970)

SCHIFFER, L. M.; NELSON, J. S.; DILETTUSO, B.; MIGLIOTORO, D.:
Cytokinetics of the S-180 Ascites Tumor System
Cell. Tiss. Kin. 6: 165 (1973)

SCHULTZE, B.:
Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm
Habilitationsschrift Würzburg 1967

SIMPSON-HERREN, L.; BLOW, J. G.; BROWN, H. P.:
The mitotic cycle of sarcoma-180
Canc. Res. 28: 724 (1968)

SIMPSON-HERREN, L.; LLOYD, H. H.:
Kinetic parameters and growth curves for experimental tumor systems
Canc. Chemotherapy 54: 143 (1970)

SILVESTRINI, R.; LENAZ, L.:
Studi di cinetica proliferativo del sarcoma ascite-180
Tumori 58: 219 (1972)

SILVESTRINI, R.; SANFILLIPPO, O.; LENAZ, L.:
Confronte tra i parametri cinetici in vivo e in vitro del sarcoma-180 solido
Tumori 58: 335 (1972)

SOMMER, I.:
Bestimmung der Zellverlustrate am soliden Experimentaltumor Sarkom-180
Ingenieur-Arbeit, Fachhochschule Jülich
KFA Jülich 1977

Stecher, G.; BLOEMERTZ, H.; PFITZER, P.:
Sarkom-180: Wachstum und Regression
Beitr. Path. 158: 255 (1970)

STEEL, G. G.; BENSTED, J. P. M.:
In-vitro studies of cell proliferation in tumours
I. Critical appraisal of methods and theoretical considerations
Europ. J. Canc. 1: 275 (1965)

STEEL, G. G.; ADAMS, K.; BARRETT, J. C.:
Analysis of the cell population kinetics of transplanted tumours of widely differing growth rate
Brit. J. Canc. 20: 784 (1966)

STEEL, G. G.:
Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours
Europ. Canc. 3: 381 (1967)

STEEL, G. G.:
Cell loss from experimental tumours
Cell. Tiss. Kin. 1: 193 (1968)

STEEL, G.G.:

The cell cycle in tumours: an examination of data gained by the technique of labeled mitoses

Cell. Tiss. Kin. 5: 87 (1972)

STEWART, H.L.; SNELL, K.C.:

Atlas of Tumor Pathology

Section XII Fascicle 40: 324 (1959)

TUBIANA, M.:

Review Article: The kinetics of tumor cell proliferation and radiotherapy

Brit. J. Rad. 44: 325 (1971)

VALLERON, A.J.; MARY, J.Y.; FRINDEL, E.;

Méthode d'analyse sur ordinateur des courbes mitoses marquées

Biomedicine 18: 118 (1973)

VAN PUTTEN, L.M.:

Are cell-kinetic data relevant for the design of tumour chemotherapy schedules?

Cell. Tiss. Kin. 7: 493 (1974)

WAGNER, H.P.:

Die Bedeutung der Zellkinetik für die Therapieplanung bei akuten Leukämien

Schweiz. Med. Wschr. 103: 1314 (1973)

WEBER, H. J.:

In-vivo Untersuchungen über Kombinationseffekte von Hyperthermie und Co-60-Bestrahlung auf oxische und hypoxische Tumorzellen bei einem soliden Experimentaltumor (Sarkom-180)

Diplom-Arbeit Giessen/KFA Jülich 1976

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. L. E. Feinendegen, Direktor des Instituts für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich GmbH, danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten und für die Stellung des Themas dieser Arbeit.
Herrn Professor Dr. O. Hess, Direktor des Instituts für Allgemeine Biologie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Übernahme des Referats und sein Interesse an dieser Arbeit.
Herrn Dr. W. Porschen möchte ich danken für die freundliche Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung.
Herrn Dr. J. Booz danke ich für seine wertvollen Hinweise und grundlegenden Diskussionen.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Phys. Ing. H. Mühlensiepen und den Mitarbeitern des Labors für experimentelle Tumortherapie für die gute Zusammenarbeit und die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

LEBENSLAUF

Am 27. Februar 1951 wurde ich, Klaus Henrichs, in Eschweiler als Sohn des Exportkaufmanns Heinz Henrichs und seiner Ehefrau Marlis Henrichs, geb. Schmitz, geboren.
Von 1957 bis 1960 besuchte ich die Katholische Volksschule in Köln-Holweide und von 1960 bis 1969 das neusprachliche J.G. Herder Gymnasium Köln-Buchheim. Im April 1969 legte ich dort das Abitur ab.
Im Wintersemester 1969 begann ich das Studium der Physik an der Universität Köln. Während dieses Studiums war ich drei Jahre lang als studentische Hilfskraft am Institut für Kernphysik beschäftigt. Im Jahre 1974 legte ich die mündliche Diplom-Hauptprüfung ab, die Diplomarbeit wurde im November 1975 beendet.

1976 begann ich meine Tätigkeit als Doktorand am Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich.
Seit dem 26.8.1977 bin ich verheiratet; meine Ehefrau ist Angelika Henrichs, geb. Fasel.

Jülich, am 25. Juni 1979

Klaus Henrichs